

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2014

Juho Kylä-Vehka

# SILIKAPOHJAISET BIOMATERIAALIT SOLUKAPSELOINTIIN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Juho Kylä-Vehka

## SILIKAPOHJAISET BIOMATERIAALIT SOLUKAPSELOINTIIN

Solukapseloinnissa käytetään biomateriaaleja, jotka ovat vuorovaikutuksessa elävien solujen kanssa. Solukapseloinnissa tarvitaan biomateriaaleja, joiden ominaisuudet ovat vastaavia kuin kohdekudoksella ja soluväliaineella. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää menetelmä vaahdotetun silikapohjaisen biomateriaalin tuottamiseksi solukapselointiin. Silikapohjaisten geelien ja vaahdotettujen materiaalien reologisia ominaisuuksia ja stabiilisuutta tutkittiin reometrillä. Lisäksi opinnäytetyössä tutkittiin solujen lisäystapaa vaahdotettuun silikapohjaiseen biomateriaaliin.

Kudokset ja soluväliaine ovat viskoelastisia. Kudoksien elastiset moduulit vaihtelevat huomattavasti rasvakudoksen 17 Pa:sta luun 30 GPa:iin. Biomateriaaleilta vaaditaan huomattavaa monimuotoisuutta elastisen moduulin osalta. Sooli-geelimenetelmällä voidaan tuottaa viskoelastisia materiaaleja, joiden elastiset moduulit vastaavat pehmytkudoksen elastista moduulia.

Opinnäytetyössä kehitettyjen materiaalien viskoelastiset ominaisuudet vaihtelivat elastisen moduulin osalta noin kymmenkertaisesti (9-100 kPa), jolloin ne soveltuvat useille solutypeille. Tuotetut vaahdotetut biomateriaalit olivat elastiselta moduuliltaan stabiileja vähintään viiden vuorokauden ajan soluviljelyolosuhteissa. Kuiva-ainepitoisuus vaikutti materiaalin elastiseen moduuliin. Suurimmalla kuiva-ainepitoisuudella saatiin noin 10 kertaa korkeampi elastinen moduuli kuin pienimmällä kuiva-ainepitoisuudella. Opinnäytetyössä tuotettujen materiaalien elastisten moduulien perusteella materiaaleja voidaan käyttää esimerkiksi lihassolujen solukapseloinnissa.

### ASIASANAT:

biomateriaalit, silika, solukasvatus, reologia, kudosteknologia, kantajamateriaali, elastinen moduuli, vaahto

Juho Kylä-Vehka

# SILICA BASED BIOMATERIALS FOR CELL ENCAPSULATION

Biomaterials used for cell encapsulation interact with living cells. The properties of biomaterials used for cell encapsulation should be similar to those of the target tissue and the extracellular matrix. The purpose of this thesis was to develop a method to produce foamed silica based biomaterials for cell encapsulation. The rheological properties and stability of silica based gels and foamed biomaterials were analyzed by means of a rheometer. A further objective was to develop a method for the addition of cells to foamed silica based biomaterials.

Tissues and extracellular matrices are viscoelastic. The elastic moduli of tissues vary significantly. Adipose tissue has a low elastic modulus of 17 Pa and the elastic modulus of bone is 30 GPa. Biomaterials require varying the elastic module. The sol-gel process can be used to produce viscoelastic materials with an elastic modulus corresponding to the elastic modulus of soft tissue.

The elastic modulus of foamed biomaterials varied between 9 kPa and 100 kPa. According to the elastic modulus of the foamed silica based biomaterials, they can be used for encapsulation of different cell types. The elastic modulus of foamed silica based biomaterials was stable for at least five days in cell culture conditions. In this study the elastic modulus was affected by dry matter content. The material with the highest dry matter content had an approx. 10 times higher elastic modulus than the material with the smallest dry matter content. The elastic moduli results suggest that the foamed silica-based biomaterials can be used for encapsulation of muscle cells.

## KEYWORDS:

biomaterials, silica, cell culture, rheology, tissue engineering, scaffold, storage modulus, foam

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 BIOMATERIAALIT</b>	<b>10</b>
2.1 Silikapohjaiset biomateriaalit	11
2.2 Biomateriaalien reologia	12
<b>3 KUDOSTEKNOLOGIA</b>	<b>13</b>
<b>4 REOLOGIA</b>	<b>17</b>
4.1 Viskositeetti	20
<b>5 REOLOGISET MITTAUKSET</b>	<b>22</b>
5.1 Reologiset mittaukset reometrillä	23
5.1.1 Rotaatiomittaukset	23
5.1.2 Oskillaatiomittaukset	24
5.2 Mittausgeometriat	25
5.2.1 Levy-levy	25
5.2.2 Kartio-levy	26
5.3 Anton Paar MCR 102-reometri	26
<b>6 SOOLI-GEELIPROSESSI</b>	<b>28</b>
<b>7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>31</b>
7.1 Soolin valmistus	31
7.2 Mediumien valmistus	32
7.3 Geelin valmistus ja geelin säilymisen tutkiminen	32
7.4 Vaahtojen valmistus	32
7.5 Reologiset mittaukset	33
7.6 Solujen lisäystavan tutkiminen	34
7.7 Vaahdon rakenteen visuaalinen tarkastelu	34

<b>8 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>35</b>
8.1 LVE-alueen määrittäminen	35
8.2 Vaahdotuksen parametrien valinta	36
8.2.1 Vaahdotusajan ja sekoitusnopeuden vaikutus	36
8.2.2 Sooli-mediumsuhteen vaikutus	37
8.3 Geelin ikääntymisen vaikutus elastiseen moduuliin	38
8.4 Vaahdon ikääntymisen vaikutus reologisiin ominaisuuksiin	40
8.5 Mediumin vaikutus vaahdon reologiaan	43
8.6 Solujen lisäystavan kehittäminen	44
8.7 Vaahdon visuaalinen tarkastelu	45
<b>9 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>46</b>
<b>10 LÄHDELUETTELO</b>	<b>48</b>

## LIITTEET

Liite 1. MCR-sarjan reometrien tekniset ominaisuudet.

## KUVAT

Kuva 1. Kudosteknologian periaate (van Blitterswijk, et al., 2008).	13
Kuva 2. Kahden levyn malli (Mezger, 2011).	17
Kuva 3. Leikkausrasitus (Dr. Santner, 2008).	18
Kuva 4. Leikkausnopeus (Dr. Santner, 2008).	18
Kuva 5. Vaihe-ero (Mezger, 2011).	19
Kuva 6. Kompleksinen leikkausmoduuli.	20
Kuva 7. Ostwald-kapillaariviskosimetri (Hackley & Ferraris, 2001).	22
Kuva 8. Brookfield-viskosimetrin havainnekuva (Hackley & Ferraris, 2001).	23
Kuva 9. Frekvenssipyyhkäisy (Anton Paar, 2013).	24
Kuva 10. Amplitudipyyhkäisy (Anton Paar, 2013).	24
Kuva 11. Levy-levymittausgeometria (Mezger, 2011).	25
Kuva 12. Kartio-levymittausgeometria (Mezger, 2011).	26
Kuva 13. Tetraetyyliortosilikaatin kemiallinen rakenne.	29
Kuva 14. Vaahdon visuaalinen tarkastelu.	45

## KUVIOT

Kuvio 1. Esimerkki LVE-alueen määrittämisestä.	35
Kuvio 2. Sooli-mediumsuhteen vaikutus vaahdotetun materiaalin elastiseen ja viskoottiseen moduuliin.	37
Kuvio 3. SiO <sub>2</sub> -pitoisuuden vaikutus vaahdotetun materiaalin elastiseen moduuliin.	38
Kuvio 4. Geelin elastisen moduulin muutos säilytyksessä.	39
Kuvio 5. Vaahdon ikääntymisen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin säilytettäessä vaahtoa +37 °C:ssa.	40
Kuvio 6. Vaahdon ikääntymisen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin säilytettäessä vaahtoa huoneenlämmössä.	41
Kuvio 7. Vaahdon ikääntymisen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin säilytettäessä vaahtoa +4 °C:ssa.	41
Kuvio 8. Vaahdon ikääntymisen vaikutus häviötekijään ( $\tan \delta$ ) säilytettäessä vaahtoa +37 °C:ssa.	42
Kuvio 9. Mediumin vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin.	43
Kuvio 10. Solujen lisäystavan vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin.	44

## TAULUKOT

Taulukko 1. Kudosten elastisia moduuleita (Levental, et al., 2007).	14
Taulukko 2. Sooli-mediumsuhteet.	33

## KÄYTETYT LYHENTEET

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RMPI	Roswell Park Memorial Institute medium
FBS	Fetal Bovine Serum, naudan sikiön verestä valmistettu seerumi
SiO <sub>2</sub>	Pioksidi, silika
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
TMOS	Tetrametyyliortosilikaatti
NaOH	Natriumhydroksidi
EtOH	Etanoli, etyylialkoholi
HCl	Suolahappo
G'	Elastinen moduuli
G''	Viskoottinen moduuli
$\tau$	Leikkausjännitys
$\dot{\gamma}$	Leikkauksenopeus
G*	Kompleksinen leikkausmoduuli
tan $\delta$	Häviötekijä
$\delta$	Vaihe-ero
$\eta$	Dynaaminen viskositeetti
$\nu$	Kinemaattinen viskositeetti
ECM	Soluväliaine

# 1 JOHDANTO

Biomateriaalit ovat materiaaleja, jotka ovat vuorovaikutuksessa elävien kudosten, organismien tai mikro-organismien kanssa (Vert, et al., 2012). Biomateriaalit voidaan jakaa kahteen ryhmään materiaalityyppien perusteella: biologisiin ja ei-biologisiin. Opinnäytetyössä keskitytään solukapselointiin käytettäviin ei-biologisiin materiaaleihin. Ei-biologiset biomateriaalit voidaan jakaa metallisiin, keraamisiin, polymeerisiin ja komposiittibiomateriaaleihin (Parida, et al., 2012).

Kudokset ja soluväliaine ovat viskoelastisia eli niillä on sekä viskoottisia ominaisuuksia että elastisia ominaisuuksia (Wells, 2008). Kudokset voidaan jakaa koviin ja pehmeisiin kudoksiin. Kovia kudoksia ovat mm. luut ja pehmeää kudosta mm. iho. Kovien kudosten elastiset moduulit ovat luokkaa gigapascal (GPa) ja vastaavasti pehmeiden kudosten elastiset moduulit ovat luokkaa pascal-megapascal (Pa-MPa). Koville kudoksille käytetään yleisesti metallisia tai keraamisia biomateriaaleja ja pehmeille kudoksille polymeeripohjaisia biomateriaaleja (Gyawali, et al., 2013). Metallisten biomateriaalien elastiset moduulit ovat luokkaa kymmeniä GPa. Muiden biomateriaalien elastiset moduulit ovat alhaisempia kuin metallisten biomateriaalien elastiset moduulit.

Kudosteknologiassa soluja yhdistetään kantajamateriaaliin, joka tarjoaa soluille niiden tarvitseman tuen ja pinnan (Barnes & Harris, 2008). Kantajamateriaalin rakenne on huokoista (Gaikwad, et al., 2008). Kantajamateriaalilta vaadittavaan huokoisuuteen vaikuttavat kohdesolut ja -kudokset (Dhandayuthapani, et al., 2011). Materiaalin huokoisuutta voidaan lisätä käyttämällä vesiliukoisia porogeenejä tai vaahdottamalla (Mikos & Temenoff, 2000). Kantajamateriaalin reologisilla ominaisuuksilla on suuri vaikutus solujen kykyyn tunkeutua materiaaliin (Owen & Shoichet, 2010)

Silikapohjaisia biomateriaaleja voidaan valmistaa sooli-geelimenetelmällä. Sooli-geelimenetelmällä tuotettujen materiaalien ominaisuudet vaihtelevat huomattavasti. Sooli-geelimenetelmällä voidaan valmistaa sekä hydrogeelejä, jotka



ovat kosteita ja pehmeitä, että xerogeelejä, jotka ovat kuivia ja kovia (Brinker & Scherer, 1990).

Hydrogeeleillä saavutetaan vastaava vesipitoisuus kuin kudoksilla. Veden määrä hydrogeelissä vaihtelee huomattavasti. Kuiva-ainepitoisuus vaikuttaa hydrogeelien elastiseen moduuliin. (Han, et al., 2013), (Pal, et al., 2009), (Rammensee, et al., 2005)

Opinnäytetyössä kehitettiin menetelmä, jolla voidaan tuottaa viskoelastisia vaahdotettuja silikapohjaisia biomateriaaleja. Silikapohjaisia biomateriaaleja tuotettiin sooli-geelimenetelmällä. Anton Paar MCR 102-reometrillä mitattiin materiaalien reologisia ominaisuuksia ja reologista stabiilisuutta (mm. elastista moduulia) solukasvatuslämpötilassa.

Opinnäytetyö suoritettiin Turun ammattikorkeakoulun biomateriaalitutkimusryhmän Cell-in-Gel-projektissa. Projekti on Turun ammattikorkeakoulun ja Åbo Akademin yhteisprojekti, jossa testataan injektoitavien, geelimäisten ja vaahtomaisten materiaalien soveltuvuutta solujen kantajamateriaaliksi.

## 2 BIOMATERIAALIT

Biomateriaali terminä määritettiin ensimmäisen kerran Concensus Conference of the European Society for Biomaterials-kokouksessa 1976, jonka mukaan biomateriaalin tulee olla ei-elävä ja sitä tulee käyttää lääketieteellisessä sovelluksessa, joka on vuorovaikutuksessa biologisen systeemin kanssa (O'Brien, 2011). Nykyisin biomateriaaliksi luokitellaan materiaalit, jotka ovat vuorovaikutuksessa elävien kudosten, organismien tai mikro-organismien kanssa (Vert, et al., 2012).

Ensimmäiset biomateriaalit eivät olleet suunniteltu biomateriaalisovelluksiin vaan ne "lainattiin" muilta tieteenaloilta seuraavien kolmen kriteerin perusteella (Santin & Phillips, 2012):

- kyky matkia korvattavan kudoksen mekaanisia ominaisuuksia
- eivät ole haitallisia elävälle kudokselle
- reagoimattomuus

Nykyisin käytetyt biomateriaalit voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden materiaalityyppien perusteella: biologisiin ja ei-biologisiin. Biologiset materiaalin koostuvat polypeptideistä (proteiinit), polysakkarideista, nukleiinihapoista, hydroksiapatiitista, jota on myös synteettisenä, tai näiden yhdistelmistä (Barbucci, 2002), (Aulakh, et al., 2009). Ei-biologiset biomateriaalit voidaan jakaa metallisiin, keraamisiin, polymeerisiin ja komposiittibiomateriaaleihin (Parida, et al., 2012).

Ideaalisen metallisen biomateriaalin tulisi olla bioyhteensopiva, korroosion kestävä, luja ja sen elastisen moduulin tulisi olla kohdekudosta vastaava (Zhou & Niinomi, 2009). Metallisten biomateriaalien ongelmana on niiden alttius korroosiolle, joka heikentää materiaalia ja tuottaa haitallisia yhdisteitä ympäröivään kudokseen ja organismiin (Parida, et al., 2012).

Alumiinioksidi, zirkoniumoksidi ja hydroksiapatiitti ovat yleisimmät aineet, joita käytetään keraamisissa biomateriaaleissa (Rosengren, et al., 2002). Keraami-

set biomateriaalit voidaan jakaa reagoimattomiin, bioaktiivisiin ja biohajoaviin materiaaleihin (Kurella & Dahotre, 2005). Keraamisia biomateriaaleja käytetään mm. metallisten proteesien pinnoitteena, jolloin keraaminen biomateriaali toimii rajapintana kudoksen ja pinnoitetun materiaalin välillä (Kurella & Dahotre, 2005). Biomateriaaleja on käytetty monissa kohteissa kuten luusementtinä, implantteina, sydämen läppinä ja piilolinsseinä (Pignatello, 2011).

Hydrogeelit, joita käytetään biomateriaaleina, koostuvat polymeeriverkostosta, jota vesi ympäröi. Hydrogeeleillä saavutetaan vastaava vesipitoisuus kuin kudoksilla. Veden määrä hydrogeelissä vaihtelee huomattavasti. Hydrogeelit ovat yleensä polymeeri- tai keraamipohjaisia. (Han, et al., 2013), (Pal, et al., 2009)

Suunniteltaessa uusia biomateriaaleja voidaan niiltä vaaditut ominaisuudet jakaa biologisiin ominaisuuksiin ja materiaaliominaisuuksiin. Vaadittuja biologisia ominaisuuksia ovat mm. bioaktiivisuus ja hylkimisreaktion estyminen. Vaadittavia materiaaliominaisuuksia ovat huokoisuus, pinnan ominaisuudet, muokkautuvuus ja säädeltävä hajoamisnopeus. (Seal, et al., 2001)

## 2.1 Silikapohjaiset biomateriaalit

Pii kuuluu samaan alkuaineryhmään kuin hiili, mutta pii eroaa huomattavasti hiilestä kemiallisilta ominaisuuksiltaan. Pii on litosfäärin toiseksi yleisin alkuaine. Eräät piin muodot ovat haitallisia soluille, mutta amorfisella ja vesiliukoisella silikan eli piioksidin muodoilla on havaittu olevan positiivisia vuorovaikutuksia organismien kanssa (Jokinen, et al., 2010). Amorfisen silikan liukoisuus veteen kudosten pH:ssa on 130-150 ppm (Innocenci, et al., 2008). (Greenwood & Earnshaw, 2001)

Sooli-geelimenetelmällä valmistettujen silikapohjaisten materiaalien ominaisuudet vaihtelevat huomattavasti riippuen veden määrästä materiaalissa. Sooli-geelimenetelmällä voidaan valmistaa sekä hydrogeelejä, jotka ovat kosteita ja pehmeitä, että xerogeelejä, jotka ovat kuivia ja kovia. (Brinker & Scherer, 1990)

Silikapohjaisia sooli-geelimenetelmällä valmistettuja hydrogeelejä voidaan käyttää solukapseloinnissa kantajamateriaalina. Silikapohjaiseen kantajamateriaaliin voidaan yhdistää solujen lisäksi lääkeaineita. Solut voidaan yhdistää sooli-geelimenetelmällä valmistettuun kantajamateriaaliin geeliytymisen yhteydessä tai geelin pinnalle. (Jokinen, et al., 2010) (Nieto, et al., 2009)

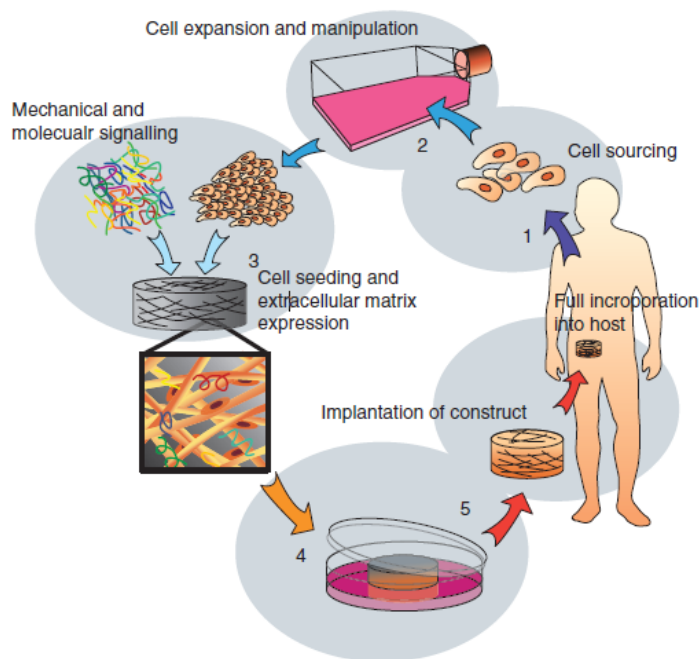
## 2.2 Biomateriaalien reologia

Biomateriaalien monimuotoisuudesta johtuen niiden reologiset ominaisuudet vaihtelevat huomattavasti. Biomateriaalilta vaadittaviin reologisiin ominaisuuksiin vaikuttavat suuresti kohdekudoksen ominaisuudet. Geelimäisillä materiaaleilla elastinen moduuli on korkeampi kuin viskoottinen moduuli (Mezger, 2011). Lämpötilan nousu alentaa biomateriaalin elastista moduulia (Giddings, et al., 2001). Kudokset voidaan jakaa koviin ja pehmeisiin kudoksiin. Kovia kudoksia ovat mm. luut ja pehmeätä kudosta on mm. iho. Koville kudoksille käytetään yleisesti metallisia tai keraamisia biomateriaaleja ja pehmeille kudoksille polymeeripohjaisia biomateriaaleja. (Gyawali, et al., 2013)

Metallisista biomateriaaleista titaanilla on alempi elastinen moduuli kuin ruostumattomalla teräksellä. Titaanin elastinen moduuli (105-114 GPa) on kuitenkin huomattavasti korkeampi kuin ihmisen luulla (10-30 GPa). Hydrogeelien elastiset moduulit ovat huomattavasti alhaisempia kuin metallisten biomateriaalien. Hydrogeeleillä elastiseen moduuliin vaikuttavat kiinteän faasin pitoisuus ja kiinteän faasin koostumus. (Rammensee, et al., 2005), (Zhou & Niinomi, 2009), (Navarro, et al., 2008)

### 3 KUDOSTEKNOLOGIA

Kudosteknologia on monitieteinen ala, joka yhdistää insinööritieteen ja biotieteiden periaatteita ja menetelmiä, ja jonka avulla tuotetaan keinotekoisia kudoksia (Heinonen, et al., 2003) (Chang & Gupta, 2010). Kudosteknologiassa soluja yhdistetään kantajamateriaaliin eli biomateriaaliin (kuva 1), joka tarjoaa soluille niiden tarvitseman tuen ja pinnan (Barnes & Harris, 2008). Kantajamateriaalin rakenne on huokoista (Gaikwad, et al., 2008). Kantajamateriaalilta vaadittavaan huokoisuuteen vaikuttavat kohdesolut ja -kudokset (Dhandayuthapani, et al., 2011). Kantajamateriaalin reologisilla ominaisuuksilla on suuri vaikutus solujen kykyyn tunkeutua materiaaliin (Owen & Shoichet, 2010). Kudokset ja soluväliaine ovat viskoelastisia (Wells, 2008).



Kuva 1. Kudosteknologian periaate (van Blitterswijk, et al., 2008).

Kantajamateriaalina käytetään biologisia ja ei-biologisia biomateriaaleja. Proteiinipohjaisia biomateriaaleja ovat mm. kollageeni, fibriini ja silkki. Polysakkaridi-

pohjaisia biomateriaaleja ovat esimerkiksi agaroozi, hyaluronaani ja kitosaani. (Willerth & Sakiyama-Elbert, 2008)

Kudosteknologiassa pehmeiden kohdekudosten reologiset ominaisuudet ja varsinkin elastiset moduulit vaihtelevat suuresti, kuten taulukosta 1 voidaan huomata.

Taulukko 1. Kudosten elastisia moduuleita (Levental, et al., 2007).

<b>Kudos</b>	<b>Elastinen moduuli</b>
Akillesjänne	310 Mpa
Selkäydin	89 kPa
Sydänlihas	20-150 kPa
Luurankolihas	12 kPa
Munuainen	2,5 kPa
Maksa	640 Pa
Rasvakudos	17 Pa

Kovilla kudoksilla, kuten luulla, elastinen moduuli on huomattavasti korkeampi kuin pehmeillä kudoksilla. Luun elastinen moduuli vaihtelee välillä 4-30 GPa riippuen luusta ja mittaussuunnasta. (Patel & Gohil, 2012)

Kantajamateriaaleilta vaaditaan (O'Brien, 2011):

- Bioyhteensopivuutta, sillä solujen pitää pystyä kiinnittymään materiaaliin, toimia normaalisti, tunkeutua materiaalin pintaan ja lopulta läpi.
- Biohajoavuutta, jotta kudoksen omat solut pystyvät aikanaan korvaamaan biomateriaalin.
- Mekaanisia ominaisuuksia, jotka ovat samankaltaisia kuin kudoksella, johon biomateriaali istutetaan.
- Kehikon rakenteen tulisi olla hyvin huokoinen, huokosten tulisi olla jatkuvia ja sisältää ravinteita soluille.

Normaalit kudosten solut vaativat kasvaakseen pinnan, johon kiinnittyä (Discher, et al., 2005).

Kantajamateriaalin huokoisuudella ja huokoskoolla on merkittävä vaikutus kudoksen muodostumiseen. Kantajamateriaalin huokoisuus mahdollistaa solujen migraation ja kasvun. Huokoisuus määritellään huokosten tilavuusosuutena materiaalin tilavuudesta. Huokoisuus on morfologinen ominaisuus, joka on riippumaton materiaalista. Huokokset voidaan jakaa koon perusteella makrohuokosiin (huokoskoko  $>50\text{ }\mu\text{m}$ ) ja mikrohuokosiin (huokoskoko  $<10\text{ }\mu\text{m}$ ). (Karageorgiou & Kaplan, 2005)

Materiaalin huokoisuutta voidaan lisätä monella tekniikalla, kuten käyttämällä vesiliukoisia porogeenejä, kuten suolaa (NaCl), joka poistuu materiaalista veteen. Materiaalin huokoisuutta voidaan lisätä myös vaahdottamalla. Vaahdossa nesteen tai kiintoaineen sisällä on kaasua kuplina. Vaahdoissa kaasukuplien kaasu voi korvautua soluviljelymediumilla solukasvatuksessa. (Danielsson, et al., 2006), (Mikos & Temenoff, 2000)

Perinteisesti soluja on kasvatettu kaksiulotteisesti (2D), jolloin solut kasvavat yhdessä kerroksessa (Caicedo-Carvajal, et al., 2012). 2D-kasvatuksessa solut eivät muodosta monimuotoisia rakenteita toisin kuin kolmiulotteisessa (3D) kasvatuksessa (Härmä, 2012). 2D- ja 3D-solukasvatuksissa solujen geenien ilmentymisessä on eroja (Caicedo-Carvajal, et al., 2012). 3D-solukasvatuksella saadaan enemmän tietoa solujen toiminnasta kudoksessa kuin 2D-solukasvatuksella (Yamada & Cukierman, 2007).

Kudoksessa soluja ympäröi soluväliaine (ECM), joka on geelimäistä ja viskoelastista, ja joka tarjoaa soluille kudoksissa pinnan johon kiinnittyä. ECM mahdollistaa lisäksi ravinteiden ja hapen diffuusion soluille (Nelson & Cox, 2000). 2D-kasvatuksessa ECM puuttuu, mutta 3D-kasvatuksessa kantajamateriaali toimii ECM:n tapaan mahdollistaen solujen kiinnittymisen. ECM vaikuttaa solujen erilaistumiseen, jakautumiseen, säilymiseen ja migraatioon. (Owen & Shoichet, 2010)

Viime aikoina kudosteknologiassa käytettyjen biomateriaalien bioaktiivisuuteen on alettu kiinnittää huomiota. Biomateriaaleihin liitetään normaalisti ECM:ssä esiintyviä signaalimolekyylejä ja kasvutekijöitä. (Chai & Leong, 2007)



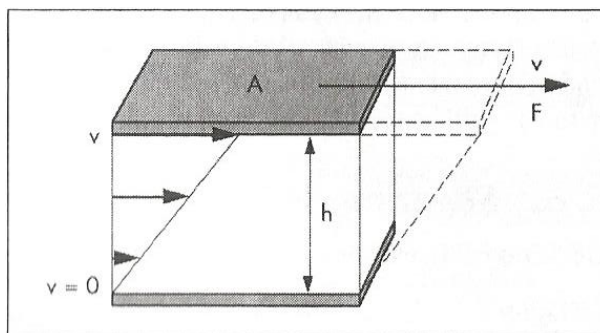
## 4 REOLOGIA

Reologia on tieteenala, joka tutkii aineen virtaus- ja muodonmuutosominaisuuksia. Sana reologia juontuu kreikan sanasta *rheos*, joka tarkoittaa virtaa (Picout & Ross-Murphy, 2003). Termin reologia otti käyttöön professori Bingham (Barnes, et al., 1993). Reologia on kirjaimellisesti virtaustiedettä. Muodonmuutos liittyy osaltaan virtaavuuteen, sillä aine voi muuttua muodonmuutoksen takia juoksevaksi.

Perinteisesti materiaalit on jaettu kahteen pääryhmään, nesteisiin ja kiinteisiin aineisiin, mutta materiaalit ovat huomattavasti monimuotoisempia. Reologiassa aineet voidaan jakaa kolmeen ryhmään: kovat kiinteät aineet, pehmeät kiinteät aineet ja nesteet (Gallegos, et al., 2004).

Nesteet voidaan jakaa kahteen pääluokkaan; newtonisiin nesteisiin ja ei-newtonisiin nesteisiin. Reologisilla mittauksilla (mm. oskillaatiomittauksilla) voi tutkia myös ei-juoksevia aineita, kuten viskoelastisia geelejä.

Kahden levyn mallia (kuva 2) käytetään määrittämään reologisia perussuureita (Mezger, 2011)

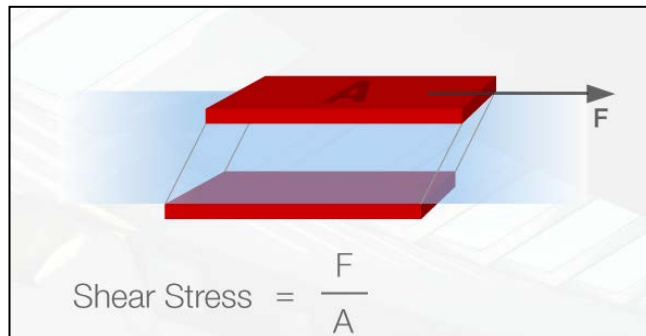


Kuva 2. Kahden levyn malli (Mezger, 2011).

Alempi levy on paikallaan ( $v=0$ ). Levyjen välistä etäisyyttä merkitään  $h$ :lla. Levyjen pinta-alaa merkitään  $A$ :lla. Ylemmän levyn kohdistetaan voima  $F$  ja ylemmän levyn nopeus mitataan.

Leikkausrasitus  $\tau$  (*Shear stress*) (kuva 3) saadaan voiman ja pinta-alan suhteesta.

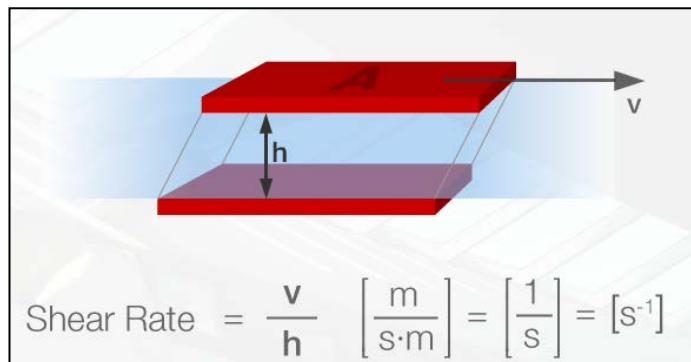
$$\tau = F/A \text{ (N)} \quad (1)$$



Kuva 3. Leikkausrasitus (Dr. Santner, 2008).

Leikkausnopeus  $\dot{\gamma}$  (*Shear rate*) (Kuva 4) saadaan liikkuvan levyn nopeuden ja levyjen välisen etäisyyden suhteesta.

$$\dot{\gamma} = v/h \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

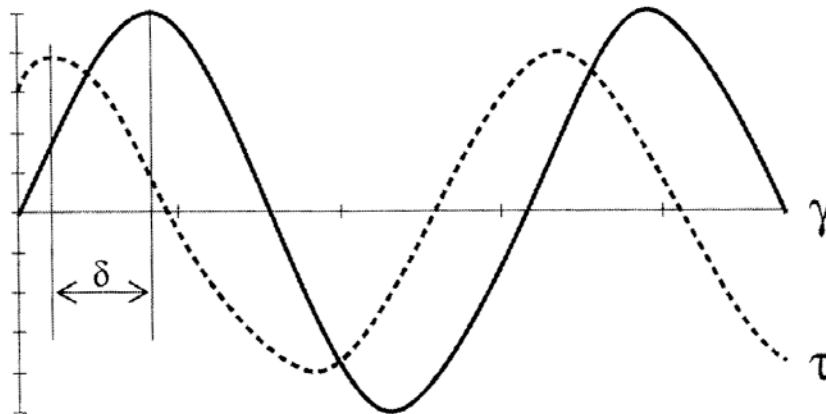


Kuva 4. Leikkausnopeus (Dr. Santner, 2008).

Oskillaatiomittauksissa kompleksinen leikkausmoduuli  $G^*$  (*complex shear modulus*) saadaan leikkausrasituksen ja leikkausnopeuden suhteena.

$$G^* = \tau(t) / \gamma(t) \text{ (Pa)} \quad (3)$$

Vaihe-erolla  $\delta$  (kuva 5) tarkoitetaan  $\tau(t)$ :n ja  $\gamma(t)$ :n välistä kulmaa. Ideaalisti elastisilla aineilla  $\delta = 0^\circ$ , newtonisilla nesteillä  $\delta = 90^\circ$  ja viskoelastisilla aineilla  $0^\circ < \delta < 90^\circ$ .



Kuva 5. Vaihe-ero (Mezger, 2011).

Elastisella moduulilla (*storage modulus*)  $G'$  tarkoitetaan deformaatioenergiaa eli muodonmuutosenergiaa, joka siirtyy aineeseen rasituksen aikana ja on rasituksen poistuttua käytettävissä.  $G'$  kuvaa aineen elastista ominaisuutta.

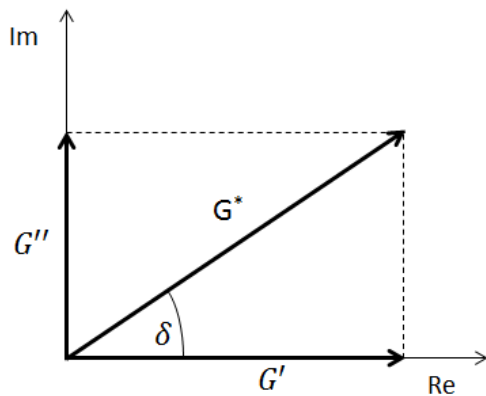
$$G' = \left( \frac{\tau}{\gamma} \right) \times \cos \delta \text{ (Pa)} \quad (4)$$

Reologiassa elastisesta moduulista käytetään myös termiä säilömoduuli tai varastomoduli.

Viskoottisella moduulilla (*loss modulus*)  $G''$ , jota kutsutaan myös häviömoduuliksi, tarkoitetaan energiaa, jonka aineen deformaatio kuluttaa ja täten energia häviää deformaatiossa. Energia voi muuttua esimerkiksi lämmöksi.  $G''$  kuvaa aineen viskoottista ominaisuutta.

$$G'' = \left( \frac{\tau}{\gamma} \right) \times \sin \delta \text{ (Pa)} \quad (5)$$

Kompleksinen leikkausmoduuli ( $G^*$ ) on sellaisen suorakulmaisen kolmion hypotenuusa, jonka kateetit ovat  $G'$  ja  $G''$  (kuva 6).



Kuva 6. Kompleksinen leikkausmoduuli.

Häviötekijä (*loss factor*)  $\tan \delta$  kertoo viskoottisen ja elastisen osuuksien suhteen.

$$\tan \delta = G''/G' \quad (6)$$

Fluideilla  $\tan \delta > 1$  ja ei-juoksevilla aineilla  $\tan \delta < 1$ .

#### 4.1 Viskositeetti

Viskositeetti on suure, jolla määritetään virtausvastus määritellyissä olosuhteissa. Viskositeettia on kahtalaista, dynaaminen ja kinemaattinen viskositeetti. Dynaamista viskositeettia merkitään tunnuksella  $\eta$  (eta), jonka SI-järjestelmän mukainen yksikkö on pascal sekunti (Pa s).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (7)$$

Kinemaattinen viskositeetti, jonka yksikkö on  $\text{m}^2/\text{s}$ , saadaan jakamalla dynaaminen viskositeetti tiheydellä.

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (8)$$

Dynaamiselle viskositeetille on aikaisemmin käytetty yksikköä Poise (P).

$$1 \text{ P} = 0,1 \text{ Pa s}$$

Kinemaattiselle viskositeetille on aikaisemmin käytetty yksikköä Stokes (St).

$$1 \text{ cSt} = 1 \text{ mm}^2/\text{s}$$

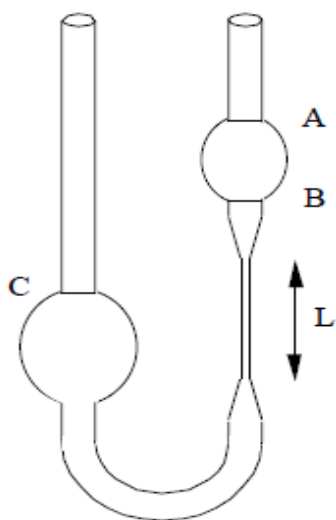
Newtonisten nesteiden viskositeetti on lämpöriippuvainen, mutta riippumaton nesteeseen kohdistetusta voimasta (Bolmstedt, 2000). Newtonisille nesteille voidaan siten määrittää yksi viskositeettiarvo tietyssä lämpötilassa.

Aineita, joiden viskositeettia ei voida määrittää tietyssä lämpötilassa yhdellä arvolla, kutsutaan ei-Newtonisiksi (Bolmstedt, 2000). Ei-Newtonisten nesteiden viskositeetti riippuu lämpötilan lisäksi nesteeseen kohdistetusta voimasta.

## 5 REOLOGISET MITTAUKSET

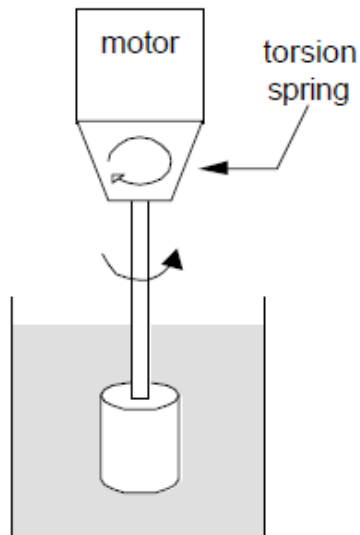
Reologisia mittauksia voidaan tehdä reometrillä ja muilla reologisilla mittauslaitteilla. Reometri on laite, jolla pystytään mittaamaan reologisia parametrejä näytteestä. Reometrejä on kahdenlaisia, vakioleikkauslaitteita (leikkausnopeutta säädetään ja jännitystä mitataan) ja vakiojännityslaitteita (leikkausjännitystä säädetään ja nopeutta mitataan) (Rinne, 1995).

Reometrin lisäksi yleisin laite reologisten suureiden mittauksessa on viskosimetri. Viskosimetri on laite, jota pääsääntöisesti käytetään aineiden viskositeetin määrittämiseen (Hackley & Ferraris, 2001). Kapillaariviskosimetriä käytetään yleisesti newtonisten nesteiden kinemaattisen viskositeetin mittaamiseen. Lasi-  
nen kapillaariviskosimetri on yksinkertaisin ja halvin kaupallisesti saatavissa oleva reologinen mittauslaitteisto. Kapillaariviskosimetrejä on useita erilaisia kuten, Ostwald, Ubbelohde ja Cannon-Fenske. Kapillaariviskosimetreillä mitataan nesteen kulkemiseen pisteestä A pisteeseen B kuluva aika (kuva 7), josta saadaan laskettua kinemaattinen viskositeetti. Kapillaariviskosimetrissä nesteeseen vaikuttavana voimana on painovoima.



Kuva 7. Ostwald-kapillaariviskosimetri (Hackley & Ferraris, 2001).

Yleisin rotaatioviskosimetrin tyyppi on Brookfield-viskosimetri, jonka havainnekuva on esitetty kuvassa 8. Rotaatioviskosimetrin rotaationopeutta pystytään säätämään.



Kuva 8. Brookfield-viskosimetrin havainnekuva (Hackley & Ferraris, 2001).

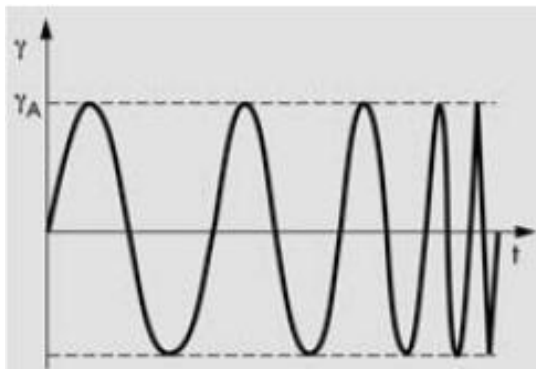
## 5.1 Reologiset mittaukset reometrillä

### 5.1.1 Rotaatiomittaukset

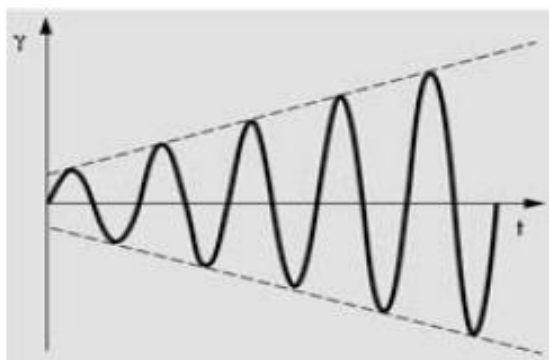
Rotaatiomittauksella saadaan dynaaminen viskositeetti eli tietoa mitattavan aineen viskoosisista ominaisuuksista (Rinne, 1995). Rotaatiomittauksista yleisin on virtausominaisuusmittaus (flow curve), jolla saadaan selville, onko neste newtoninen tai ei-newtoninen, kuten leikkausohentuva tai leikkauspaksuuntuva.

### 5.1.2 Oskillaatiomittaukset

Oskillaatiomittauksella saadaan tietoa mitattavan aineen viskoelastisuudesta. Yleisimmät oskillaatiomittaukset ovat frekvenssi- ja amplitudipyyhkäisy. Frekvenssipyyhkäisyssä (kuva 9) taajuutta muutetaan amplitudin ollessa vakio ja amplitudipyyhkäisyssä (kuva 10) amplitudia muutetaan taajuuden ollessa vakio.



Kuva 9. Frekvenssipyyhkäisy (Anton Paar, 2013).



Kuva 10. Amplitudipyyhkäisy (Anton Paar, 2013).



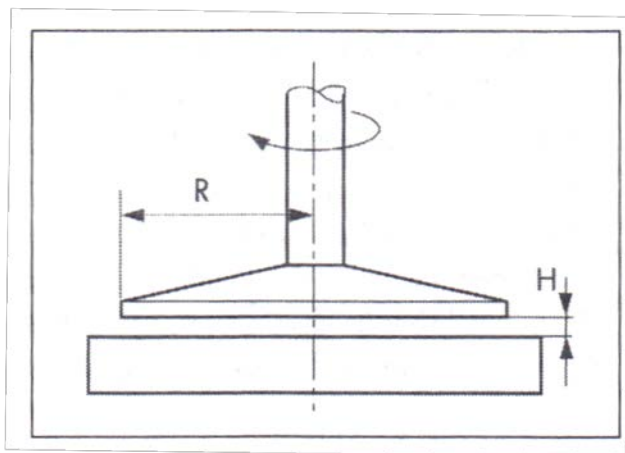
Amplitudipyyhkäisyllä saadaan selville lineaarinen viskoelastinen alue (LVE). Frekvenssipyyhkäisyssä käytetään LVE-alueella olevaa amplitudia. LVE-alueella oleva amplitudi ei tuhoa materiaalin rakennetta. (Mezger, 2011)

## 5.2 Mittausgeometriat

Yleisimmät reologisissa mittauksissa käytetyt mittausgeometriat ovat levy-levy ja kartio-levy. Muita mittausgeometrioita ovat mm. erilaiset sylinterimittausgeometriat (Mezger, 2011).

### 5.2.1 Levy-levy

Levy-levymittaussysteemi (kuva 11) koostuu kahdesta levystä. Alempi levy on yleensä paikallaan pysyvä ja ylempi levy on liikkuva (Mezger, 2011).

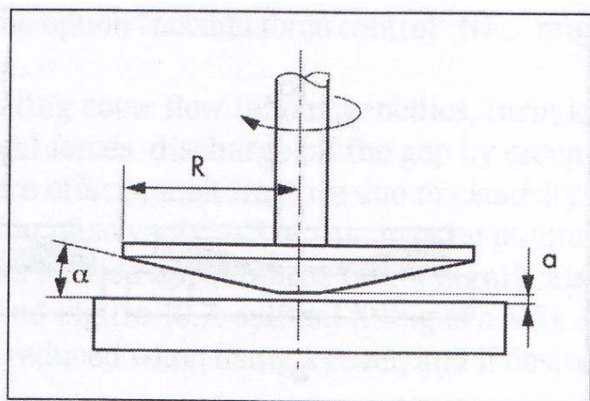


Kuva 11. Levy-levymittaausgeometria (Mezger, 2011).

Levy-levymittaausgeometrian etu on mahdollisuus mitata näytteitä, joissa on suu-  
rikokoisia partikkeleita. Levy-levymittaausgeometriassa mittauspään säde ( $r$ ) ja  
levyjen välinen etäisyys ( $H$ ) voivat muuttua. (Mezger, 2011)

### 5.2.2 Kartio-levy

Kartio-levymittaussysteemi (kuva 12) koostuu levystä ja kartiosta. Paikallaan pysyvä levy on yleensä alempana ja liikkuva kartio on ylempänä (Mezger, 2011).



Kuva 12. Kartio-levymittausgeometria (Mezger, 2011).

Kartio-levymittausgeometriassa kartion ja levyn välinen etäisyys, kartion säde ja kartion kulma  $\alpha$  voivat muuttua. Yleensä kulma  $\alpha$  on n.  $1^\circ$ , mutta se voi korkeintaan olla  $4^\circ$ . Kartio-levymittausgeometriassa näytteen suurimpien partikkelien tulee olla kooltaan alle 20 % kartion ja levyn välisestä etäisyydestä. (Mezger, 2011)

### 5.3 Anton Paar MCR 102-reometri

Opinnäytetyössä käytetty MCR (Modular compact Rheometer) 102 on Anton Paarin valmistama modulaarinen reometri. MCR-sarjan muita reometrejä ovat MCR 52, MCR 302 ja MCR 502. MCR-sarjan reometrit on varustettu elektronisesti säädettävällä moottorilla (EC-moottori), joka mahdollistaa niiden tarkan säätelyn. MCR 102-reometrillä voidaan suorittaa sekä rotaatio- että oskillaatiomittauksia. MCR 102-reometrillä on mahdollista käyttää monia mittauserioita kuten levy-levy-, kartio-levy- ja sylinterigeometrioita. MCR 102-reometriä voidaan käyttää laajalla lämpötila-alueella ( $-150$ – $1000^\circ\text{C}$ ) riippuen

käytettävästä lämpötilasäädinmoduulista. Toolmaster™-tekniikka tunnistaa MCR-reometriin liitetyt moduulit. TruGap™-tekniikka mahdollistaa levy-levy- ja kartio-levymittausgeometrioissa tarkan etäisyyden mittauksen nopeasti. MCR-sarjan reometreihin on mahdollista liittää mikroskooppi näytteen visuaalista tarkastelua varten. MCR 102-reometri on varustettu ilmalaakeroinnilla. (Anton Paar, 2011) (Anton Paar, 2010)

MCR-sarjan reometrien tekniset tiedot on esitetty liitteessä 1.

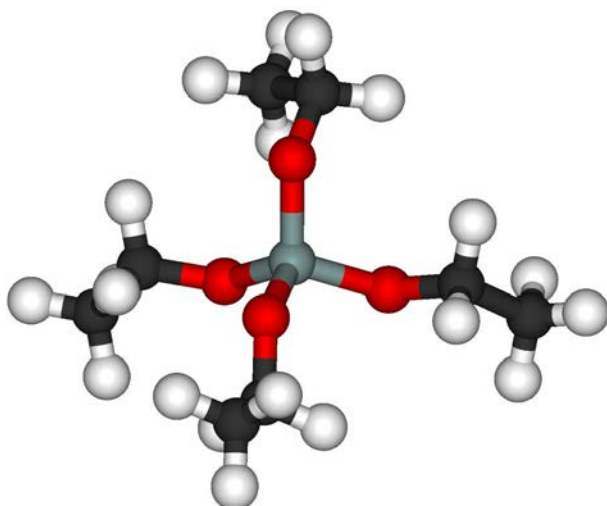
## 6 SOOLI-GEELIPROSESSI

Sooli-geelimenetelmä koostuu kahdesta päävaiheesta, joista ensimmäisessä valmistetaan soolia, joka on kolloidinen suspensio, josta muodostuu geeliä kondensaation ja aggregaation kautta. Soolin elastinen moduuli on alhaisempi kuin viskoottinen moduuli. Geelillä elastinen moduuli on korkeampi kuin viskoottinen moduuli. Geelipisteessä elastisen moduulin ja viskoottisen moduulin arvot ovat yhtä suuria. Elastinen moduuli kasvaa geelipisteen jälkeen. (Brinker & Scherer, 1990), (Shchipunov, 2003), (Jokinen, et al., 1998)

Sooli-geelimenetelmä on laajasti käytössä valmistettaessa mm. keraamisia materiaaleja. Menetelmässä käytetään yleisesti käytössä olevia lähtömateriaaleja ja katalyyttejä. Menetelmässä soolin valmistus tapahtuu huoneenlämmössä ja veden tai muodostuneen alkoholin poistossa ei tarvita korkeita lämpötiloja. (Young, 2006)

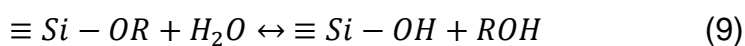
Sooli on kolloidinen suspensio, jossa dispergoitunut kiinteä faasi on niin pieninä partikkeleina, että painovoimalla ei ole merkittävää vaikutusta partikkeleihin, vaan vuorovaikutuksia määrittää lyhyen etäisyyden voimat, kuten van der Waals-vuorovaikutus ja pinnan varaukset (Brinker & Scherer, 1990). Geelissä jatkuva faasi on kiinteä ja dispergoitunut faasi nestettä. Hydrogeelissä dispergoitunut faasi koostuu vedestä.

Sooli-geelimenetelmän lähtöaineina käytetään yleisemmin alkoksiedeja, jotka ovat alkoholien konjugaattiemäksiä. Silikasynteisien lähtöaineista yleisimmät ovat tetraetyyliortosilikaatti (TEOS), jonka rakenne on esitetty kuvassa 13, ja tetrametyyliortosilikaatti (TMOS). Silikapohjaisten lähtöaineiden lisäksi käytetään siirtymämetallipohjaisia ja metallipohjaisia lähtöaineita. (Brinker & Scherer, 1990)



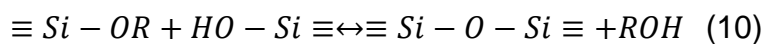
Kuva 13. Tetraetyyliortosilikaatin kemiallinen rakenne.

Alkoksisilaanin reagoiessa veden kanssa hydrolyysireaktiossa OR-ryhmä korvautuu OH-ryhmällä ja samalla muodostuu alkoholia ROH, joka tetraetyyliortosilikaatin tapauksessa on etanolia ja tetrametyyliortosilikaatin tapauksessa metanolia. Soolin valmistuksessa käytetyn veden ja alkoksisilaanin moolisuhde ilmoitetaan R-arvona.

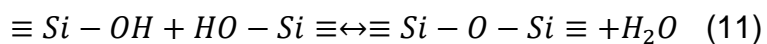


Hydrolyysireaktion ja sen vastareaktion esterifikaation tasapainoon vaikuttavat reaktio-olosuhteet. Hydrolyysireaktiossa katalyyttinä voi toimia happo tai emäs.

Hydrolyysireaktiota seuraa alkoholikondensaatioreaktio ja sen vastareaktio alkoholyyysi. Kondensaatiossa muodostuu siloksaanisidos.



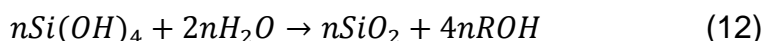
Kondensaatioreaktiossa muodostuu vettä hydroksiryhmien reagoiessa.



Kondensaatioreaktion nopeuteen vaikuttaa seoksen pH ja lämpötila. Happamis-  
sa olosuhteissa kondensaatio tapahtuu hitaasti ja pH 7:ssä kondensaatio on  
nopeinta. Kondensaatioreaktion seurauksena seokseen muodostuu silikapoly-  
meeriverkosto. Soolin maturaatiolla tarkoitetaan happamissa olosuhteissa soo-  
lissa tapahtuvaa kondensaatiota. Kondensaatioreaktion tapahtuminen hitaasti  
alhaisessa pH:ssa vaikuttaa sooli-geeliprosessin ominaisuuksiin. Kondensaa-  
tiolla on nostava vaikutus elastiseen moduuliin. Opinnäytetyössä geeliytymis-  
ajalla tarkoitetaan aikaa, joka kuluu soolin pH:n nostosta geelipisteeseen. Gee-  
liytymisaikaan voidaan vaikuttaa pH:n muutoksella. (Brinker & Scherer, 1990),  
(Shchipunov, 2003)

Kondensaatioreaktio ei pysähdy geelipisteeseen. Geelipisteessä seoksessa on  
vielä silikaa, joka ei ole liittynyt polymeeriverkostoon. Geelissä silika voi liittyä  
polymeeriverkostoon. Silikan liittyminen polymeeriverkostoon vaikuttaa geelin  
ominaisuuksiin ja rakenteeseen. (Brinker & Scherer, 1990)

Soolin muodostumisen kokonaisuhtälöstä havaitaan, että jokaista lähtötilanteen  
alkoksisilaanimolekyyliä kohti muodostuu neljä alkoholimolekyyliä.



R-arvo 2 on teoreettisesti pienin arvo, jolla kaikki alkoksisilaani reagoi, mutta  
käytännössä R-arvolla 2 alkoksisilaani ei reagoi täydellisesti.

Reaktiossa syntyvä alkoholi on soluille toksista. Alkoksisilaanit eivät ole-  
vesiliukoisia. Syntynyt alkoholi liuottaa toisiinsa liukenemattomat alkoksisilaani-  
ja vesifaasit. Soluille toksinen alkoholin määrää voidaan vähentää soolista  
haihduttamalla. (Nieto, et al., 2009), (Jokinen, 2014), (Brinker & Scherer, 1990)

## 7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön käytännön osuudessa kehitettiin prosessi, jolla voidaan tuottaa vaahdotettua silikapohjaista biomateriaalia solukapselointiin. Silikasooliin sekoitetaan soluviljelymediumia ja seos vaahdotetaan. Vaahdotuksessa sooli-mediumseokseen sekoitetaan ilmakuplia. Materiaali on vaahdon ja geelin yhdistelmä. Mediumin pH:n johdosta kondensaatio nopeutuu. Vaahdotettua biomateriaalia pidettiin onnistuneena, jos se visuaalisesti oli tasalaatuista. Vaahdotetun biomateriaalin soveltuvuutta solukapselointiin tutkittiin tutkimalla vaahdotetun biomateriaalin säilyvyyttä soluviljelymediumissa. Säilyvyyttä tutkittaessa verrattiin tuoreen vaahdotetun silikapohjaisen biomateriaalin elastista moduulia soluviljelymediumissa säilytettyjen vaahdotettujen biomateriaalien elastisiin moduuleihin. Silikageeleihin solut voidaan lisätä pH:n nostossa käytettävässä soluviljelymediumissa (Tuovinen, 2012). Vaahdotettaessa materiaaliin kohdistuu sekoittimen aiheuttamia voimia. Opinnäytetyössä käytetty vaahdotuslaitteisto on tarkoitettu homogenisointiin, jonka aiheuttamat voimat ovat vahingollisia soluille. Soluja ei voida lisätä ennen vaahdotusta materiaaliin vaahdotuslaitteen aiheuttamien voimien takia. Solujen lisäystapaa kehitettäessä osa mediumista lisättiin jo vaahdotettuun materiaaliin. Solujen lisäystapa katsottiin onnistuneeksi, jos materiaalin elastinen moduuli ei eronnut sellaisen materiaalin elastisesta moduulista, jonka vaahdotuksessa medium oli lisätty sooliin kokonaisuudessaan ennen vaahdotusta.

### 7.1 Soolin valmistus

Soolien valmistukseen käytettiin tetraetyyliortosilikaattia (TEOS) (98 %, Sigma Aldrich), suolahappoa (HCl) (Merck) ja vettä, jonka resistanssi oli 18,2 MΩ (Millipore Milli-Q-puhdistuslaitteisto). Veden ja TEOS:n moolisuhteena suolahapon (HCl) katalysoimassa hydrolyysissä käytettiin 70:tä (R-arvo). Happoa lisättiin reaktioon siten, että lopullisessa soolissa hapon pitoisuus oli 0,01 M. Valmistettaessa 50 ml soolia, reaktio tapahtui 250 ml dekantterilasissa jatkuvalla sekoit-

tuksella. TEOS lisättiin vesi-happo-liuokseen erissä (7 x 1 ml ja 0,52 ml) 2 minuutin välein. Sekoitusta jatkettiin kunnes ei ollut havaittavissa eri faaseja. Reaktiossa syntyvän etanolin (EtOH) pitoisuutta pienennettiin soolista haihduttamalla. Haihduttamisessa sooli lämmitettiin 60 °C:een ja sooliin lisättiin vettä (20 ml) n. nelinkertainen määrä syntyneeseen etanoliin verrattuna. Soolia lämmitettiin, kunnes tilavuus oli alentunut alle 50 ml:ksi, jonka jälkeen tilavuus säädettiin 50 ml:ksi vedellä. Sooli jäähdytettiin ja säilytettiin +4 °C:ssa.

## 7.2 Mediumien valmistus

Työssä käytettiin sekä Dulbecco's Modified Eagle Medium -mediumia (DMEM F12 (1:1), Life Technologies) ja Roswell Park Memorial Institute 1640, Hepes-mediumia (RPMI, Life Technologies). Mediumeihin lisättiin 10 % naudan sikiön seerumia (FBS). Mediumien pH:ta nostettiin 1M natriumhydroksidilla (NaOH) (Oy FF-Chemicals Ab) geeliytymisen nopeuttamiseksi. 49,5 ml:aan mediumin ja FBS:n seosta lisättiin 1,955 ml 1 M NaOH:a.

## 7.3 Geelin valmistus ja geelin säilymisen tutkiminen

Tutkittaessa geelin reologisten ominaisuuksien muutosta säilytyksessä, geelit valmistettiin nostamalla soolin pH:ta DMEM/FBS/NaOH -mediumilla. Geelit valmistettiin sooli-mediumsuhteella 2:1. Geeliytymisessä käytettiin soolia ja mediumia, jotka olivat huoneenlämpöisiä. Tutkittaessa geelien säilyvyyttä mediumissa, geelien muodostumisen jälkeen niiden päälle lisättiin DMEM-mediumia. Geelejä säilytettiin 37 °C:ssa ennen reologisia mittauksia.

## 7.4 Vaahtojen valmistus

Vaahdotuksessa sooli ja medium yhdistettiin 50 ml dekantterilasiin, jossa vaahdotus suoritettiin Ultra-Turrax T25-homogenisaattorilla (d=18 mm). Vaihtelemal-



la vaahdotusaikaa ja vaahdotusnopeutta määritettiin vaahdotukseen parhaiten soveltuvat parametrit. Tutkittaessa vaahdotusnopeutta ja vaahdotusaikaa mediumina käytettiin DMEM/FBS/NaOH-mediumia. Tutkittaessa eri mediumien vaikutusta käytettiin sekä DMEM/FBS/NaOH- ja RPMI/FBS/NaOH-mediumeja.

Visuaalisesti parhaimmaksi vaahdotusajaksi osoittautui 4 min ja vaahdotusnopeudeksi 9500 rpm, jonka jälkeen syntynyt vielä nestemäinen materiaali laitettiin IKA KS 130 Basic-tasoravistelijaan asetuksella 240 rpm.

Materiaalin annettiin kovettua tasoravistelijassa, jonka jälkeen materiaalin päälle laitettiin mediumia. Materiaalin kovettuessa muodostui geeli-vaahtoyhdistelmä.

Tutkittaessa sooli-mediumsuhteen vaikutusta syntyvän vaahdon reologiaan valmistettiin taulukon 2 mukaiset vaahdot käyttäen mediumina DMEM/FBS/NaOH-mediumia. R70-soolin  $\text{SiO}_2$ -pitoisuus teoreettisesti on 40,5 mg/ml. Taulukossa 2  $\text{SiO}_2$ -pitoisuus on ilmoitettu vaahdotettavan materiaalin (sooli+medium)  $\text{SiO}_2$ -pitoisuutena.

Taulukko 2. Sooli-mediumsuhteet.

Sooli-mediumsuhde	Soolin määrä (ml)	Mediumin määrä (ml)	$\text{SiO}_2$ -pitoisuus (mg/ml)
1:1	2,5	2,5	20,24
2:1	4	2	27,00
3:1	4,5	1,5	30,37
4:1	4	1	32,40

Tutkittaessa vaahtojen säilymistä vaahtoja säilytettiin +4 °C:ssa, huoneenlämmössä ja +37 °C:ssa.

## 7.5 Reologiset mittaukset

Anton Paar MCR 102-reometrille suoritettiin ennen mittauksia alustus (*Initilize*), jonka jälkeen käytetty mittapää kiinnitettiin reometriin ja suoritettiin levyn

ja mittapään etäisyyden säätö (*Zero Gap*). Reometrisissä mittauksissa reometrin alalevyn peltier-elementin lämpötilaksi säädettiin 25 °C. Geeleille ja vaahdoille suoritettiin amplitudipyyhkäisy (*Amplitude Sweep*) lineaarisen viskoelastisen alueen määrittämiseksi. AS-mittauksissa käytetyt parametrit:

- Venymä (*Strain*) 0,01-100 %
- Kulmataajuus (*Angular Frequency*) 10 rad/s
- Mittapää PP15 (Levy-levy mittausero, d=15 mm) (Anton Paar)

Vaahdoille ja geeleille suoritettiin taajuuspyyhkäisy (*Frequency Sweep*), joilla määritettiin materiaalin pysyvyyttä ajan funktiona soluviljelymediumissa. FS-mittauksissa käytetyt parametrit:

- Venymä (*Strain*) 1 %
- Kulmataajuus (*Angular Frequency*) 100-0,1 rad/s
- Mittapää PP15 (Levy-levy mittausero, d=15 mm) (Anton Paar)

## 7.6 Solujen lisäystavan tutkiminen

Solujen lisäystavan tutkimisessa 1/15 -osa mediumista, joka soluja lisättäessä sisältäisi solut, lisättiin vaahdotettuun materiaaliin vaahdotuksen jälkeen ennen tasoravistelijan siirtoa. Solulisäystapaa kehitettäessä sekä medium että sooli olivat 37 °C:n lämpöisiä. Solujen lisäystapaa tutkittaessa ei käytetty soluja.

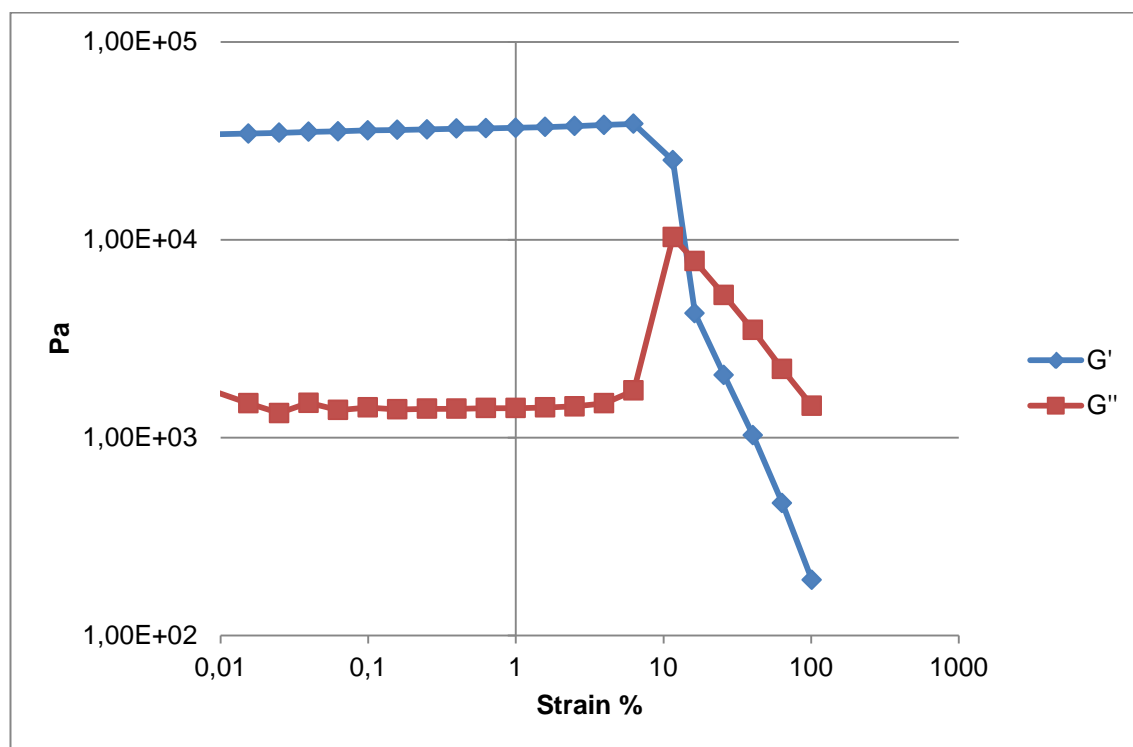
## 7.7 Vaahdon rakenteen visuaalinen tarkastelu

Vaahdon rakennetta tutkittaessa valmistettiin 3:1-suhteella vaahtoa käyttäen DMEM-mediumia. Vaahtoa tutkittiin valomikroskoopilla ja kuvaamalla valomikroskooppiin liitetyllä kameralla (Nikon Coolpix E995).

## 8 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

### 8.1 LVE-alueen määrittäminen

Vaahdotetuilta biomateriaaleilta ja geeleiltä määritettiin AS-mittauksilla LVE-alueet. FS-mittauksissa tulee käyttää sellaista voimaa, joka ei hajota näytteen rakennetta (Mezger, 2011). Kuviosta 1 nähdään, että Strain-arvo 1 % on LVE-alueella kyseisellä materiaalilla. FS-mittauksiin valittiin Strain-arvo 1 %. Kuvion 1 mukaan materiaali on viskoelastista.



Kuvio 1. Esimerkki LVE-alueen määrittämisestä.

Muilla vaahdotetuilla biomateriaaleilla ja geelillä Strain-arvo 1 % on myös LVE-alueella.

## 8.2 Vaahdotuksen parametrien valinta

Valmistettaessa vaahdotettua biomateriaalia kokeiltiin erilaisia parametrejä vaahdotuksessa. Kokeiltuja parametrejä olivat vaahdotusaika, sooli-medium-suhde, soolin ja mediumin lämpötilat, vaahdotuksen sekoitusnopeus ja soolin lisäystapa.

### 8.2.1 Vaahdotusajan ja sekoitusnopeuden vaikutus

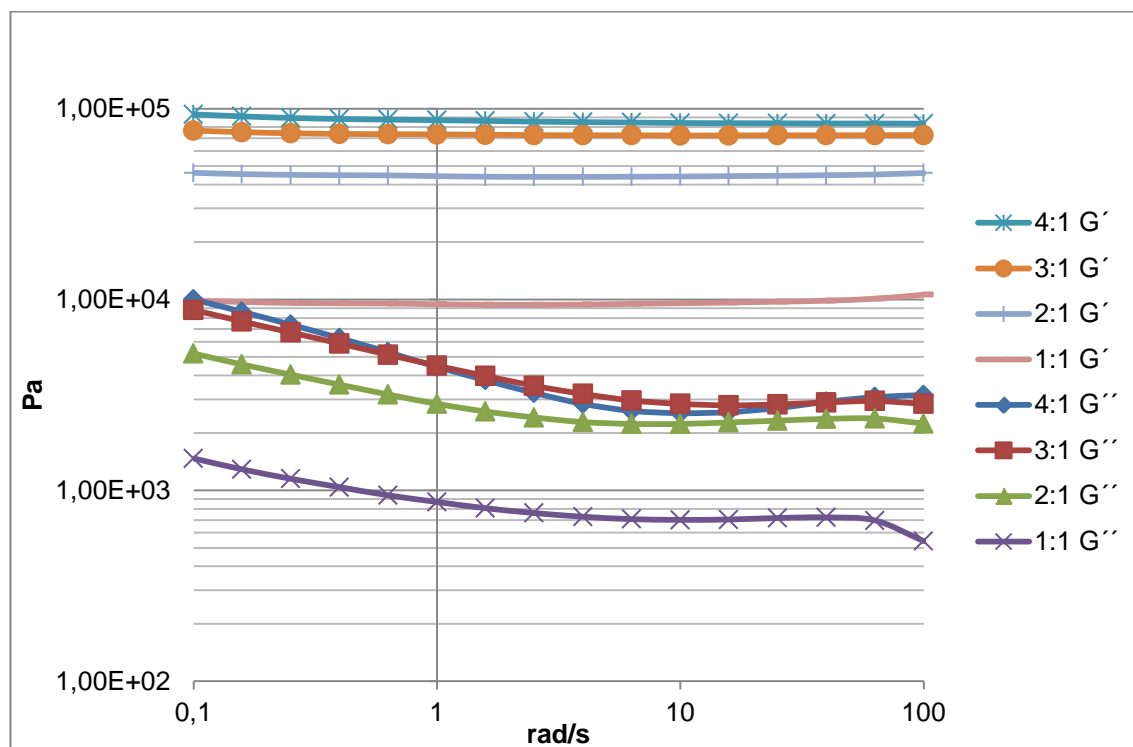
Käytettäessä lyhyitä vaahdotusaikoja vaahtoon muodostuneet ilmakuplat eivät visuaalisesti jakaannu näytteessä tasaisesti geeliytymisen tapahtuessa. Vaahdotusajan ylittäessä geeliytymisajan tuloksena on rikkoutunut geelirakenne. Jotta vaahdotuksessa muodostuneet ilmakuplat pysyisivät materiaalissa tasaisesti jakautuneena ja materiaalin rakennetta ei rikkoutuisi, valittiin vaahdotusajaksi alle geeliytymisajan oleva aika, jonka jälkeen syntynyt vaahdotettu materiaali laitettiin tasoravistelijaan. Käytettäessä tasoravistelijaa saadaan vaahdotettua biomateriaalia, jonka rakenne on silmämääräisesti tasalaatuista. Soolin matuuraatio vaikuttaa geeliytymisaikaan laskevasti (Tuovinen, 2012).

Vaahdotusta suoritettiin eri sekoitusnopeuksilla (8000 rpm, 9500 rpm, 13500 rpm ja 20500 rpm). 20500 rpm:n sekoitusnopeudella materiaali lämpeni ja osa materiaalista pisaroitui sekoitusastian seinämille, joten materiaalin koostumuksesta ei voida olla täysin varmoja.

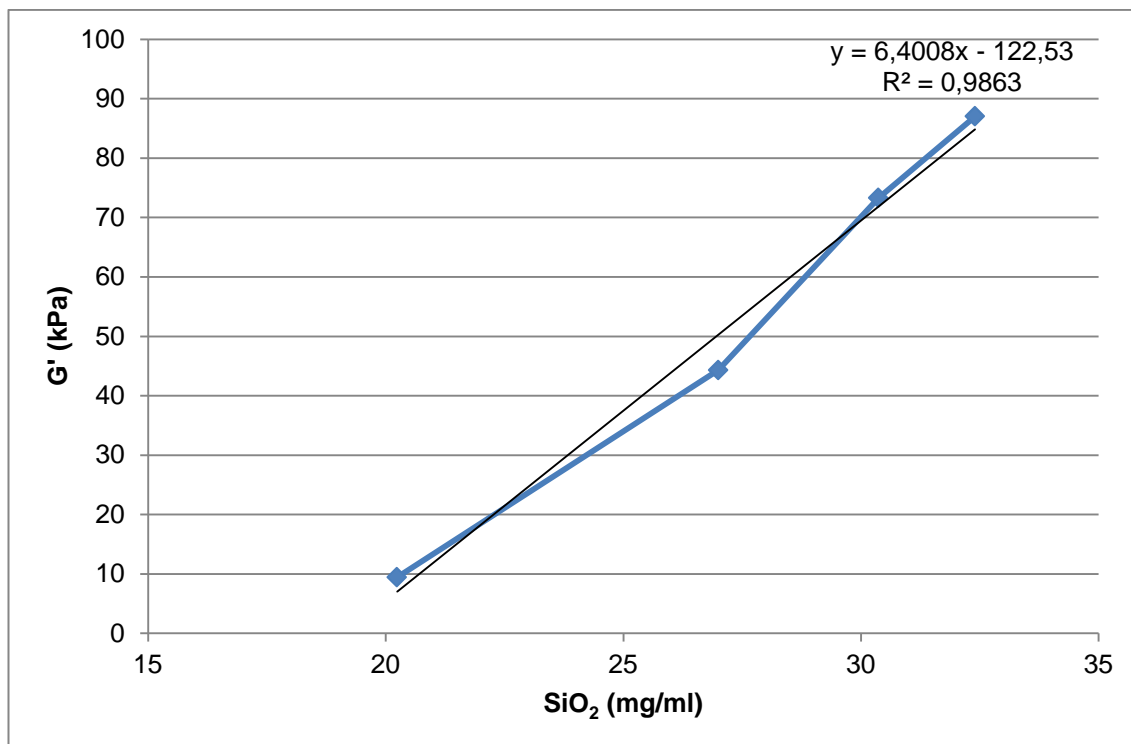
Sekoitusnopeudeksi valittiin 9500 rpm, sillä nopeus oli riittävä saamaan aikaiseksi silmämääräisesti tasalaatuista materiaalia ja materiaali ei lämmennyt huomattavasti vaahdotuksen aikana. Sekoitusajaksi valikoitui 4 minuuttia, jonka jälkeen vaahdotettu materiaali siirrettiin tasoravistelijaan. Materiaalia ravisteltiin geelipisteen yli, jonka seurauksena saatiin aikaiseksi materiaalia, jossa ilmakuplat ovat visuaalisesti tarkasteltuna jakautuneet tasaisesti.

### 8.2.2 Sooli-mediumsuhteen vaikutus

Sooli-mediumsuhteen vaikutusta tutkittaessa vaahdotettiin taulukon 2 mukaisesti sooli-mediumseokset. Käyttäen mediumina DMEM/FBS/NaOH-mediumia saatiin FS-mittauksista kuvion 2 ja kuvion 3 mukaiset tulokset.



Kuvio 2. Sooli-mediumsuhteen vaikutus vaahdotetun materiaalin elastiseen ja viskoottiseen moduuliin.



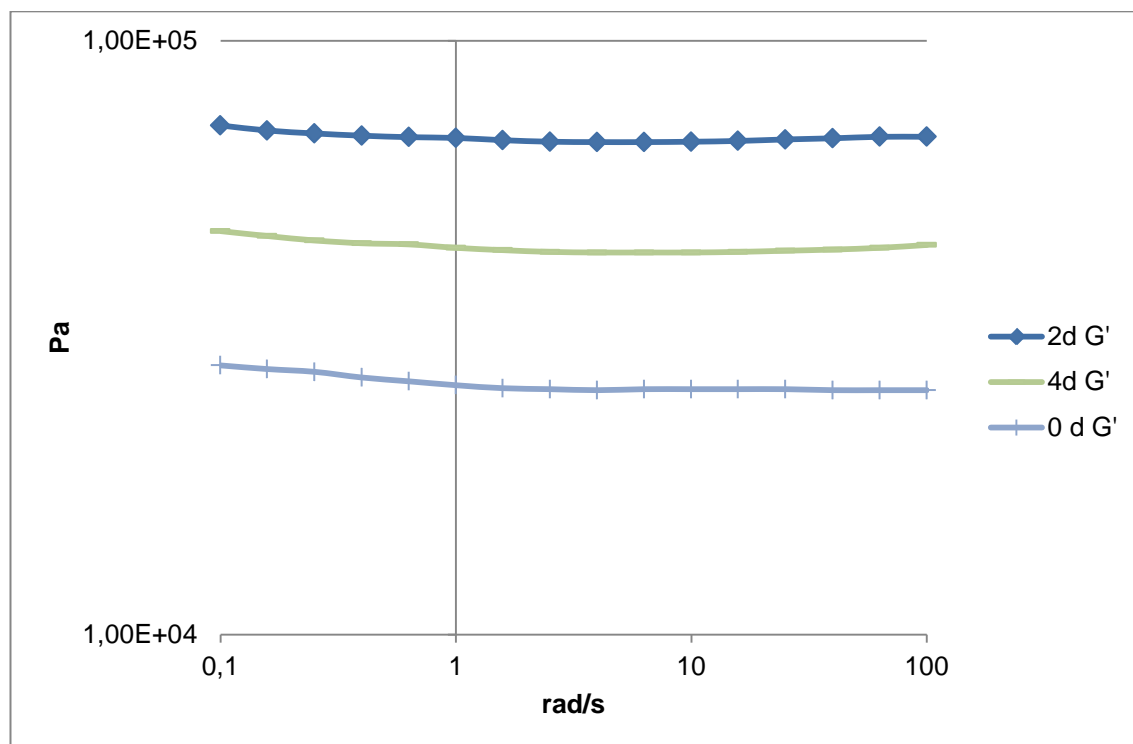
Kuvio 3. SiO<sub>2</sub>-pitoisuuden vaikutus vaahdotetun materiaalin elastiseen moduuliin.

Sooli-mediumsuhteella on selkeä vaikutus materiaalin reologisiin ominaisuuksiin. Soolin osuuden kasvaessa syntyneessä materiaalissa on enemmän kiintoainetta (taulukko 2). Soolin osuuden kasvaessa elastinen moduuli kasvaa. Kirjallisuuden mukaan hydrogeelien kuiva-ainepitoisuuden nousu nostaa elastista moduulia (Rammensee, et al., 2005). Suhteella 1:1 valmistettu vaahto ei ole ideaali solukasvatukseen, sillä lisättäessä mediumia vaahton päälle, vaahto kelluu mediumin päällä. Kellumisen johdosta vaahto ei ole kokonaisuudessaan nesteessä.

### 8.3 Geelin ikääntymisen vaikutus elastiseen moduuliin

Geelin ikääntymistä tutkittaessa valmistettiin R70-soolistä ja DMEM/FBS/NaOH-mediumista geeliä suhteella 2:1. Geelien päälle lisättiin DMEM-mediumia estämään kuivumista ja mallintamaan solukasvatusolosuhteita. Geelejä säilytettiin 37 °C:ssa. Eri-ikäisille geeleille suoritettiin FS-mittaukset. Kuviossa 4 on esitetty

tuoreen, 2 päivää vanhan ja 4 päivää vanhan geelin elastiset moduulit. Tuoreella geelillä elastinen moduuli on alhaisin, jonka jälkeen elastinen moduuli nousee (2 d geeli). 4 päivää vanhan geelin elastinen moduuli on tuoreen ja 2 päivää vanhan geelin elastisten moduulien välissä.



Kuvio 4. Geelin elastisen moduulin muutos säilytyksessä.

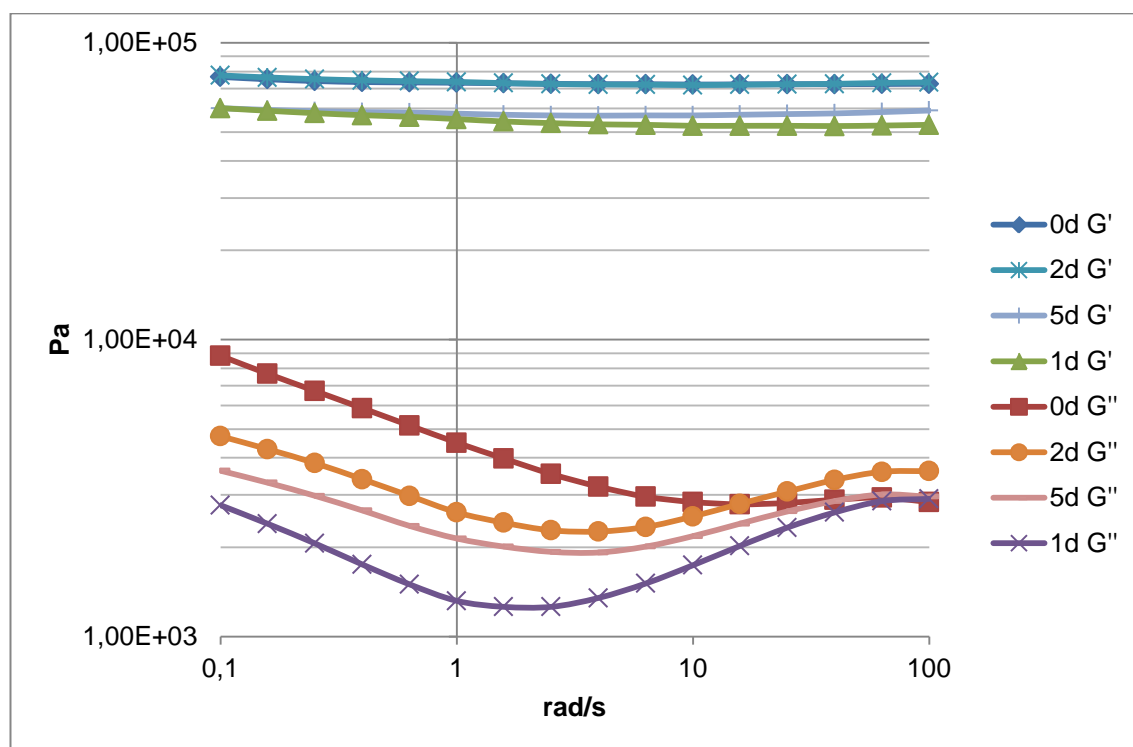
Elastisen moduulin nousulla geelin säilytyksen aikana on vaikutusta materiaalin käyttöön solukasvatuksessa, sillä elastisen moduulin kasvun myötä aineesta tulee kiinteämpää. Elastisen moduulin kasvun seurauksena materiaali soveltuu paremmin toiselle solutyypille kuin tuore materiaali (Levental, et al., 2007). Elastisen moduulin nousu johtuu geelissä tapahtuvan kondensaation jatkumisesta geelipisteen jälkeen (Brinker & Scherer, 1990).

Tuoreen geelin elastista moduulia (25-28 kPa) vastaavia elastisia moduuleita esiintyy selkäytimessä ja lihaksissa. Kirjallisuuden mukaan useimpien silika- ja polyakryyliamidigeelien elastiset moduulit vaihtelevat välillä 10-100 kPa (Brown, et al., 2005), (Shchipunov, 2003). Geelin, jota on säilytetty 2 päivää mediumissa

37 °C:ssa, elastista moduulia (68-72 kPa) vastaavia elastisia moduuleita esiintyy valtimoissa. (Levental, et al., 2007)

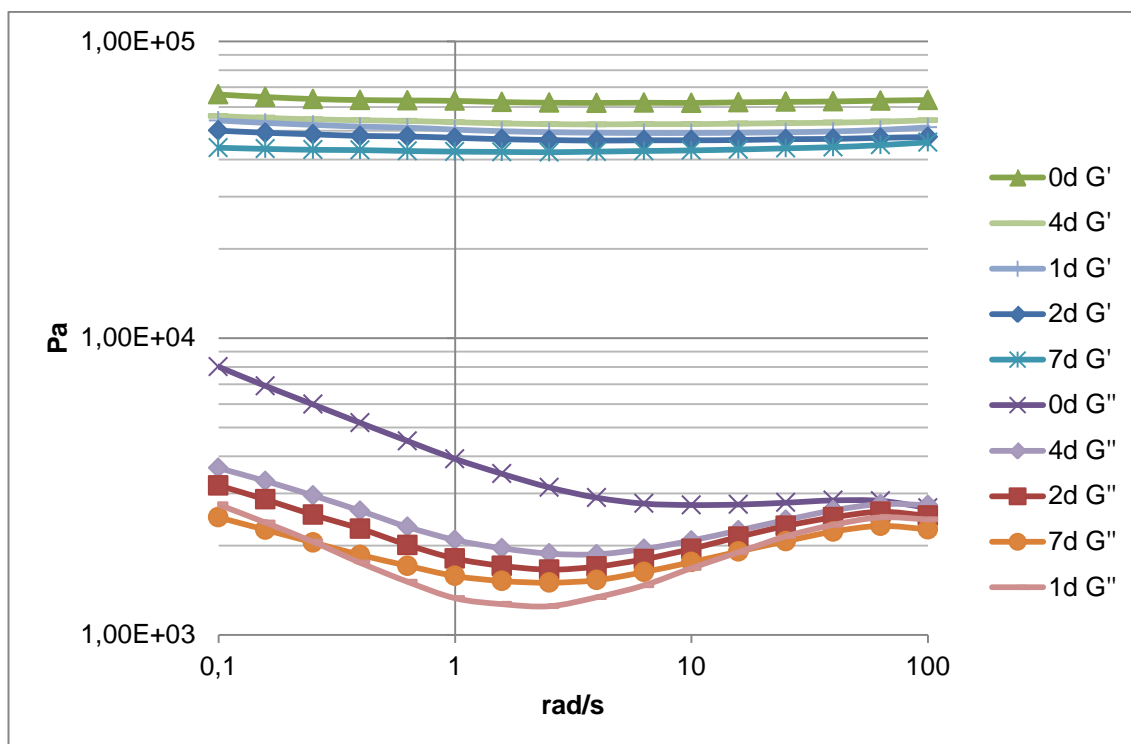
#### 8.4 Vaahdon ikääntymisen vaikutus reologisiin ominaisuuksiin

Tutkittaessa vaahdon ikääntymisen vaikutusta vaahdon reologisiin ominaisuuksiin vaahtoja säilytettiin kolmessa eri lämpötilassa, +4 °C:ssa, huoneenlämmössä ja +37 °C:ssa DMEM-mediumissa. Vaahtojen ikääntymisen vaikutukset vaahtojen reologisiin ominaisuuksiin eri lämpötiloissa on esitetty kuviossa 5, kuviossa 6, kuviossa 7 ja kuviossa 8.

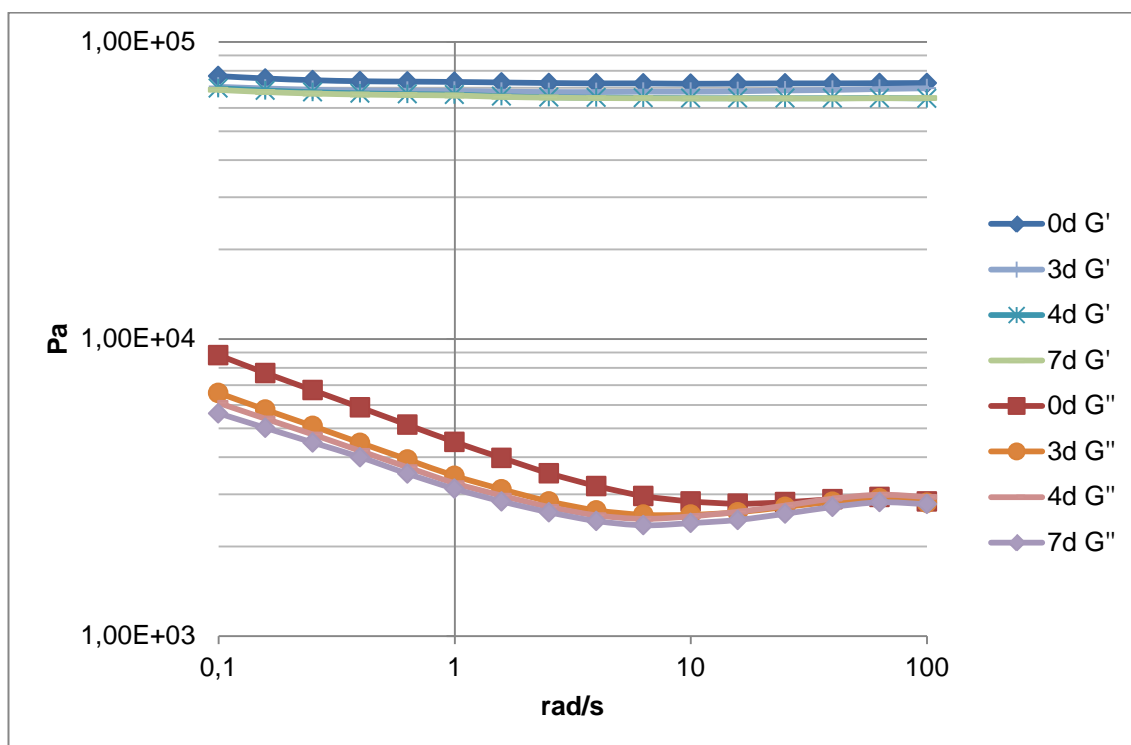


Kuvio 5. Vaahdon ikääntymisen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin säilytettäessä vaahtoa +37 °C:ssa.



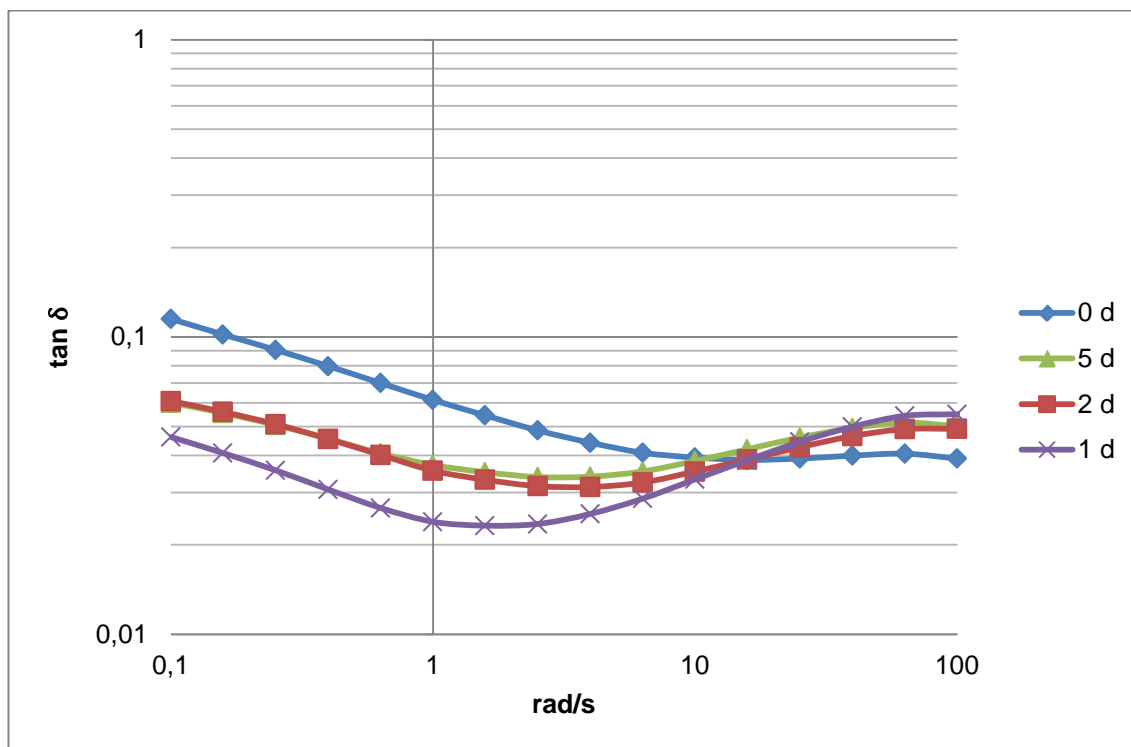


Kuvio 6. Vaahdon ikääntymisen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin säilytettäessä vaahtoa huoneenlämmössä.



Kuvio 7. Vaahdon ikääntymisen vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin säilytettäessä vaahtoa +4 °C:ssä.

Säilytettäessä vaahtoa +37 °C:ssa ja huoneenlämmössä huomataan selkeä muutos viskoottisessa moduulissa, mutta tätä muutosta ei huomata säilytettäessä vaahtoa +4 °C:ssa. Säilytettäessä vaahtoa +37 °C:ssa ja huoneenlämmössä vaahdon viskoottinen moduuli laskee huomattavasti pienillä kulmataajuuksilla.



Kuvio 8. Vaahdon ikääntymisen vaikutus häviötekijään ( $\tan \delta$ ) säilytettäessä vaahtoa +37 °C:ssa.

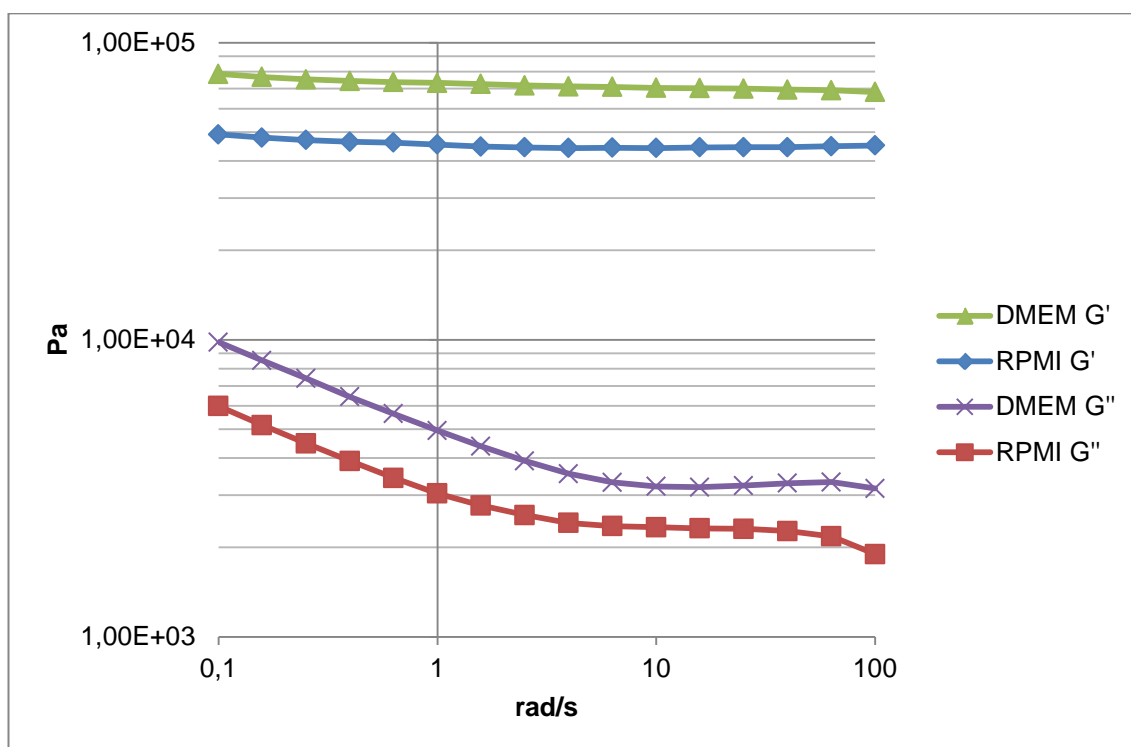
Vaahdossa olevien kaasukuplien kaasu voi korvautua soluviljelymediumilla säilytettäessä materiaalia mediumissa (Danielsson, et al., 2006). Kaasun korvautuminen mediumilla lisää nesteen osuutta materiaalissa. Nesteen osuuden lisääntyminen materiaalissa aiheuttaa kiintoaineen massaosuuden pienenemisen.

Säilytys +4 °C:ssa ei vaikuta vaahdon elastiseen moduuliin. Säilytettäessä +37 °C:ssa tai huoneenlämmössä elastinen moduuli alenee, mutta toisin kuin geelillä (kuvio 4), elastinen moduuli ei säilytyksen aikana kasva suuremmaksi kuin

tuoreen vaahdon elastinen moduuli. Elastisessa moduulissa tapahtuva aleneminen säilytettäessä vaahtoa mediumissa +37 °C:ssa ei vaikuta siihen, mille solutyypille vaahto on elastisen moduulin perusteella soveltuva.

### 8.5 Mediumin vaikutus vaahdon reologiaan

Tutkittaessa eri mediumien vaikutusta vaahtojen reologiaan valmistettiin 3:1-suhteella (sooli-medium) vaahtoja käyttäen kahta eri mediumia DMEM/FBS/NaOH- ja RPMI/FBS/NaOH-mediumia. FS-mittausten tulokset on esitetty kuviossa 9.



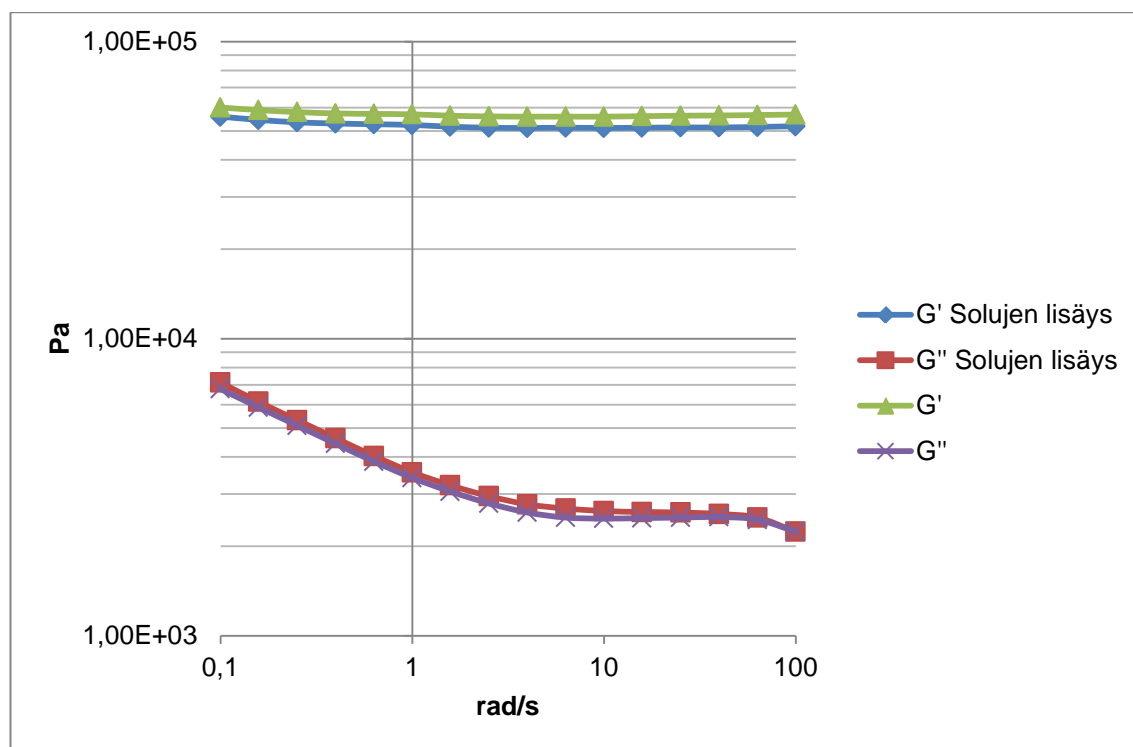
Kuvio 9. Mediumin vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin.

Eri mediuumeilla on vaikutusta vaahtojen reologiaan. Vaahdolla, joka sisältää DMEM-mediumia, on korkeammat elastiset ja viskoottiset moduulit kuin vaahdolla, joka sisältää RPMI-mediumia. Eri mediuumeista valmistettujen vaahtojen ainoana erona valmistuksessa on eri mediumit. DMEM- ja RPMI-mediumit sisältävät eri pitoisuuksia mm. ioneja, aminohappoja, vitamiineja ja sokereita.

DMED-medium sisältää glukoosia 3151 mg/l ja RPMI-medium sisältää glukoosia 2000 mg/l. Aikaisempien tutkimuksien mukaan sokeripitoisuus vaikuttaa reologisiin ominaisuuksiin. Mediumien glukoosipitoisuuden erot vaikuttavat osaltaan eroavaisuuteen elastisissa moluuleissa. Mediumien natriumbikarbonaattipitoisuuksien ero (DMEM 1200 mg/l ja RPMI 2000 mg/l) vaikuttaa mediumien puskurointikykyyn.

## 8.6 Solujen lisäystavan kehittäminen

Tutkittaessa solujen lisäystavan vaikutusta vaahtoon 1/15 -osa mediumista lisättiin vaahdotuksen jälkeen ennen tasoravistelijaa. Kuviossa 10 verrataan FS-mittauksilla vaahtoja, joista toiseen on lisätty kaikki medium ennen vaahdotusta ja toiseen 1/15 -osa mediumista on lisätty vaahdotuksen jälkeen ennen tasoravistelijaa.

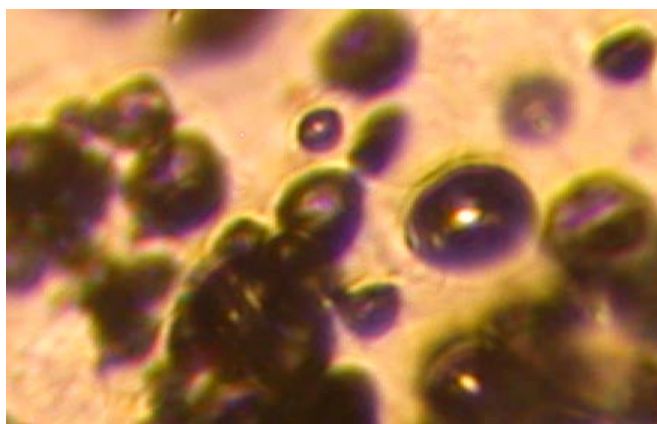


Kuvio 10. Solujen lisäystavan vaikutus elastiseen ja viskoottiseen moduuliin.

1/15 -osan lisäys vaahdotuksen jälkeen ennen tasoravistelijaa ei vaikuta huomattavasti materiaalin reologisiin ominaisuuksiin. Verrattaessa kuvion 9 DMEM  $G'$ :a ja kuvion 10  $G'$ :a, joiden ainoa ero on vaahdotuksessa käytettyjen materiaalien lämpötilaerot, huomataan reagenssien lämpötilan vaikuttavan elastisen moduuliin. Kuviossa 9 reagenssit ovat huoneenlämpöisiä ja kuviossa 10 reagenssien lämpötila on 37 °C. Reagenssien korkeampi lämpötila vaikuttaa laskevasti materiaalin elastiseen moduuliin. Havainto vastaa aikaisempia havaintoja.

### 8.7 Vaahdon visuaalinen tarkastelu

Tutkittaessa yhtä vaahtoa visuaalisesti mikroskopoimalla havaittiin vaahdossa olevan erikokoisia kuplia, kuten voidaan huomata kuvasta 14.



Kuva 14. Vaahdon visuaalinen tarkastelu.

Vaahdon rakenne ei ole visuaalisesti tarkasteltuna aivan tasainen.

## 9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Solukapseloinnissa käytettävien materiaalien kehittämisessä materiaalin ominaisuuksia pyritään saamaan mahdollisimman lähelle kohdekudoksen ja soluväliaineen ominaisuuksia. Soluväliaine ja kudokset ovat viskoelastisia, kuten kaikki opinnäytetyössä käytetyt silikapohjaiset vaahdot ja geelit. Kaikkien opinnäytetyössä valmistettujen sekä geelien että vaahtojen elastiset moduulit ovat välillä 10-100 kPa, poikkeuksena sooli-mediumsuhteella 1:1 valmistettu vahto, jonka elastinen moduuli on alle 10 kPa. Materiaalien elastiset moduulit vastaavat aikaisempien tutkimuksien havaintoja.

Selkäytimen, valtimoiden, sydänlihaksen ja lihasten elastiset moduulit ovat välillä 10-100 kPa. Elastisten moduulien perusteella opinnäytetyössä valmistetut geelit ja vaahdot soveltuvat näille solutyypeille.

Tutkittaessa eri sooli-mediumsuhteen vaikutusta vaahdon reologisiin ominaisuuksiin tulokseksi saatiin, että soolin osuuden kasvaessa elastinen moduuli kasvaa. Soolin osuuden kasvaessa vaahdossa on enemmän silikaa, joka muodostaa vaahdon kiintoaineen. Silikapitoisuuden kasvaessa materiaaliin muodostuu tiheämpi silikaverkosto. Elastisen moduulin kasvu kuiva-ainepitoisuuden kasvaessa vastaa aikaisempien tutkimusten tuloksia.

Tutkittaessa geelin säilymistä mediumissa soluviljelylämpötilassa (37 °C) saatiin tulokseksi, että geelin elastinen moduuli nousee säilytyksen aikana. Sooligeeliprosessissa kondensaatio jatkuu geelipisteen jälkeen. Kondensaation jatkuminen nostaa elastista moduulia. Tutkittaessa vaahtojen säilytystä mediumissa soluviljelylämpötilassa vastaavaa elastisen moduulin nousua ei havaittu. Säilytys soluviljelylämpötilassa vaikuttaa enemmän vaahdon viskoottiseen moduuliin kuin elastiseen moduuliin. Osaltaan elastisen moduulin nousun puuttuminen vaahdoilla voi johtua vaahdon ilmakuplien kaasun korvautumisella mediumilla. Opinnäytetyössä valmistetut vaahdot ovat elastisen moduulin osalta stabiileja vähintään 5:n päivän ajan säilytettäessä vaahtoja mediumissa soluviljelylämpötilassa.

Silikageeleihin solut voidaan liittää ennen geelitymistä tai pinnalle. Vaahdotettuun silikapohjaiseen materiaaliin solut voidaan liittää mediumissa vaahdottamisen jälkeen ennen geelipistettä. Opinnäytetyössä solujen lisäystä testattiin lisäämällä 1/15 -osa mediumista vaahdotuksen jälkeen vaahdotettuun materiaaliin. 1/15 -osan mediumin lisäämisellä vaahdotuksen jälkeen ei ole vaikutusta vaahdotetun silikapohjaisen materiaalin elastiseen moduuliin.

Vaahdon silikapitoisuuteen voidaan vaikuttaa sooli-mediumsuhteella ja soolin R-arvolla. Silikapitoisuuden muutokset vaikuttavat vaahdon elastiseen moduuliin. Suuremmalla silikapitoisuudella saadaan vaahtoja, joilla on korkeampi elastinen moduuli kuin vaahdoilla, joissa silikapitoisuus on pienempi. Vaahdon elastisen moduulin muutokset vaikuttavat siihen, mille solutyypeille materiaali on soveltuva. Silikapitoisuuden pienentäminen voidaan saavuttaa käyttämällä suuremman R-arvon soolia ja/tai käyttämällä pienempää sooli-mediumsuhdetta. Pienemmällä silikapitoisuudella voidaan tuottaa vaahtoja, joiden elastiset moduulit ovat soveltuvia mm. kilpirauhas-, munuais- ja keuhkosoluille, joka voidaan saavuttaa käyttämällä pienemmän R-arvon soolia ja/tai suurempaa sooli-mediumsuhdetta. Silikapitoisuutta suurentamalla voidaan tuottaa vaahtoja, jotka soveltuvat jännesoluille.

Vaahtojen mekaanisiin ominaisuuksiin vaikuttavat vaahdotettava materiaali ja vaahdon kuplien geometria. Vaahdotuksessa silikaverkostoon kohdistuu voimia, jotka voivat aiheuttaa verkoston uudelleenjärjestelyä verkoston muodostuksen aikana.

Valmistettaessa silikapohjaisia vaahtoja solukapselointiin tulee solutyypin normaalin kasvu ympäristön mekaaniset olosuhteet ottaa huomioon. Solujen kasvua ja jakautumista tulee tutkia aseptisesti valmistetussa vaahdossa.

## 10 LÄHDELUETTELO

Anton Paar, 2010. *MCR Application-specific Accessories for Structure Analysis-esite*.

Anton Paar, 2011. *MCR The Modular Compact Rheometer Series esite*.

Anton Paar, 2013. *Tests and Rheometers Available for the Rheological Characterization of Food by Anton Paar*.

Aulakh, T., Jayasekera, N., Kuiper, J.-H. & Richardson, J., 2009. Long-term clinical outcomes following the use of synthetic hydroxyapatite and bone graft in impaction in revision hip arthroplasty. *Biomaterials*, 30(9).

Barbucci, R., 2002. *Integrated Biomaterial Science*. Hingham: Kluwer Academic Publishers.

Barnes, H. A., Hutton, J. F. & Walters, K., 1993. *An Introduction to Rheology*. 3rd toim. Amsterdam: ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V..

Barnes, S. & Harris, L., 2008. *Tissue Engineering: Roles, Materials and Applications*. Hauppauge: Nova Publishers.

Bolmstedt, U., 2000. Viscosity & Rheology Theoretical and practical considerations in liquid food processing. *New Food Volume*, 3(2).

Brinker, J. & Scherer, G., 1990. *SOL-GEL SCIENCE: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Prosessing*. San Diego: ACADEMIC PRESS, INC.

Brown, X., Ookawa, K. & Wong, J., 2005. Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologicallyrelevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Biomaterials*, 26(16).

Caicedo-Carvajal, C., Liu, Q., Goy, A. & Suh, K., 2012. Three-Dimensional Cell Culture Models for Biomarker Discoveries and Cancer Research. *Translational Medicine*.



Chai, C. & Leong, K., 2007. Biomaterials Approach to Expand and Direct Differentiation of Stem Cells. *Molecular Therapy*, 15(3).

Chang, J. & Gupta, G., 2010. *Tissue Engineering for the Hand*. Singapore: World Scientific Publishing Company.

Danielsson, C., Simonet, M., Neuenschwander, P. & Frey, P., 2006. Polyesterurethane foam scaffold for smooth muscle cell tissue engineering. *Biomaterials*, 27(8).

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, S., 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, Volume 2011.

Discher, D., Jamney, P. & Wang, Y.-I., 2005. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Materials and Biology*, Issue 310.

Dr. Santner, F., 2008. *Basics of Rheometry, Rotation*, Graz: Anton Paar® GmbH.

Gaikwad, V., Patil, A. & Gaikwad, M., 2008. Scaffolds for Drug Delivery in Tissue Engineering. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, Issue 1.

Gallegos, C., Franco, J. & Partal, P., 2004. RHEOLOGY OF FOOD DISPERSIONS. *Rheology Reviews 2004*.

Giddings, V., Kurtz, S., Jewett, C., Foulds, J. & Edidin. A., 2001. A small punch test technique for characterizing the elastic modulus and fracture behavior of PMMA bone cement used in total joint replacement. *Biomaterials*, 22(13).

Greenwood, N. & Earnshaw, A., 2001. *Chemistry of the Elements*. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Gyawali, D., Nair, P., Kim, H. & Yang, J., 2013. Citrate-based biodegradable injectable hydrogel composites for orthopedic applications. *Biomaterial Science*, 1(1).

- Hackley, V. & Ferraris, C., 2001. Guide to Rheological Nomenclature: Measurements in Ceramic Particulate Systems. *NIST Special Publication 946*.
- Han, L.-H., Lai, J., Yu, S. & Yang, F., 2013. Dynamic tissue engineering scaffolds with stimuli-responsive macroporosity formation. *Biomaterials*, 34(17).
- Heinonen, M., Nieminen, O. & Nordström, K., 2003. *Viranomaisvalvonta kudosteknologian tuotekehityksessä*, Helsinki: TEKES.
- Härmä, V., 2012. *A Farewell to Flat Biology*. Turku: Turun Yliopisto.
- Innocenci, P., Zub, Y. & Vadim, K., 2008. Sol-Gel Methods for Materials Processing. *NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security*.
- Jokinen, M., 2014. *Yliopettaja* [Haastattelu] (10.3.2014).
- Jokinen, M., Györvary, E. & Rosenholm, J., 1998. Viscoelastic characterization of three different sol-gel derived silica gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(2).
- Jokinen, M., Jalonen, H., Forsback, A.-P. & Koskinen, M., 2010. *Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof*. s.l. Patenttinro US 20100119500 A1.
- Karageorgiou, V. & Kaplan, D., 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27).
- Kurella, A. & Dahotre, N., 2005. Review paper: Surface Modification for Bioimplants: The Role of Laser Surface Engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 20(5).
- Levental, I., Georges, P. & Janmey, P., 2007. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*.
- Mezger, T. G., 2011. *The Rheology Handbook*. 3rd toim. Hannover: Vincentz Network.

- Mezger, T. G., 2011. *The rheology handbook : for users of rotational and oscillatory rheometers*. 3 rd ed. Hanover: Vincentz Network.
- Mikos, A. & Temenoff, J., 2000. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, 3(2).
- Navarro, M., Michiardi, A., Castano, O. & Planell, J., 2008. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of The Royal Society Interface*, 5(27), pp. 1137-1158.
- Nelson, D. & Cox, M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3. ed. New York: Worth Publisher.
- Nieto, A., Areva, S., Wilson, T., Viitala, R., & Vallet-Regi, M., 2009. Cell viability in wet silica gel. *Acta Biomaterialia*, 5(9).
- O'Brien, F. J., 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, Issue 14.
- Owen, S. & Shoichet, M., 2010. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH A*.
- Pal, K., Banthia, A. & Majumdar, D., 2009. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications –A mini review. *Designed Monomers and Polymers*, 12.
- Parida, P., Behera, A. & Mishra, S., 2012. Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 1(3).
- Patel, N. & Gohil, P., 2012. A review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2(4).
- Picout, D. & Ross-Murphy, S., 2003. Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. *The Scientific World Journal*, 3
- Pignatello, R., 2011. *Biomaterials Science and Engineering*. Rijeka: InTech.

Rammensee, S. ym., 2005. Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Applied Physics A –Materials Science & Processing*.

Rinne, H., 1995. *VISKOSITEETIN MITTAUS*. Espoo: OY G.W.BERG & CO AB.

Rosengren, Å., Pavlovic, E., Oscarsson, S., Krajewski, A., Ravaqlioli, A. & Piancastelli, A., 2002. Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials*, 23(4).

Santin, M. & Phillips, G. J., 2012. *Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: An Introduction to Integrating Materials with Tissues*. Hoboken: Wiley.

Seal, B. L., Otero, T. C. & Panitch, A., 2001. Polymeric biomaterial for tissue and organ regeneration. *Material Science and Engineering: R: Reports*, 34(4-5).

Shchipunov, Y., 2003. Sol–gel-derived biomaterials of silica and carrageenans. *Journal of Colloid and Interface Science*, Issue 268.

Tuovinen, M., 2012. *SiO<sub>2</sub> -soolin käyttöominaisuudet ja solujen kapselointi SiO<sub>2</sub>-hydrogeeliin*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

van Blitterswijk, C., 2008. *Tissue Engineering*. s.l.:Elsevier Inc..

Wells, R., 2008. The Role of Matrix Stiffness in Regulating Cell Behavior. *Hepatology*, Issue 47.

Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. & Schue, F., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2).

Willerth, S. & Sakiyama-Elbert, S., 2008. *Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery*. St. Louis: StemBook.

Yamada, K. & Cukierman, E., 2007. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, 130(4).

Young, S. K., 2006. Sol-Gel Science for Ceramic Materials. *Material Matter*.

Zhou, Y.-L. & Niinomi, M., 2009. Effects of Nd Content on the Dynamic Elastic Modulus and Mechanical Properties of Titanium-Neodymium Alloys. *Materials Transactions*, 2.

## MCR-sarjan reometrien tekniset ominaisuudet (Anton Paar, 2011)

	Yksikkö	MCR 52	MCR 102	MCR 302	MCR 502
Laakerointi		Kuula	Ilma	Ilma	Ilma
EC- moottori		Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Maksimi vääntö	mNm	200	200	200	230
Min.vääntö, rotaatio	nNm	250µNm	50	10	10
Min. vääntö, oskillaatio	nNm	-	10	2	2
Väännön resoluutio	nNm	100	0.5	0.1	0.1

### Kulmaheijastus

(asetettu arvo)	µrad	1 to ∞	1 to ∞	0.1 to ∞	0.1 to ∞
Kulmaheijastus resoluutio	nrad	10	10	10	10
Min. Kulmanopeus	rad/s	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>
Max. Kulmanopeus	rad/s	314	314	314	314
Max. Nopeus	1/min	3000	3000	3000	3000
Max. kulmataajuus	rad/s	628	628	628	628
Min. Kulmataajuus	rad/s	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>
Normaalivoima alue	N	-	0.01-50	0.005-50	0.005-50
Normaalivoima resoluutio	mN	-	1	0.5	0.5
Lämpötila-alue	°C	-150 - +1000	-150 - +1000	-150 - +1000	-150 - +1000
Toolmaster™		On	On	On	On
QuickConnect		On	On	On	On

### Automaattinen gap säätö/ asetus (AGC/AGS)

TruGap™		Ei	On	On	On
T-Ready™		Ei	On	On	On
TruRate™		Ei	On	On	On
TruStrain™		Ei	Optio	On	On